

8/15

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Juni 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/059143 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/77, C07K 14/34

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRÖGER, Burkhard [DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Franz-Stützel-Str. 8, 67346 Speyer (DE). KLOPPROGGE, Corinna [DE/DE]; Rastatter Str. 10, 68239 Mannheim (DE). SCHRÖDER, Hartwig [DE/DE]; Benzstr. 4, 69226 Nußloch (DE). HAEFNER, Stefan [DE/DE]; Luitpoldstrasse 11, 67063 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014263

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Dezember 2004 (15.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 59 595.3 18. Dezember 2003 (18.12.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF Aktiengesellschaft; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PGRO EXPRESSION UNITS

(54) Bezeichnung: PGRO-EXPRESSIONSEINHEITEN

AA	PgcA	KlonNr.	BB					
1	2	3	4	5	6	7	Kontrolle	M

208

PycA →

119

94

51,1

28,8

AA... CLONE NO.
BB... CHECK

(57) Abstract: The invention relates to the use of nucleic acid sequences for regulating gene transcription and expression, said novel promoters and expression units, methods for modifying or inducing the gene transcription rate and/or expression rate, expression cassettes containing said expression units, genetically modified microorganisms having a modified or induced transcription rate and/or expression rate, and methods for producing biosynthetic products by cultivating said genetically modified microorganisms.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/059143 A1



MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

Pgro-Expressionseinheiten

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter 10 oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

Verschiedene biosynthetische Produkte, wie beispielsweise Feinchemikalien, wie unter 15 anderem Aminosäuren, Vitamine aber auch Proteine werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, Feed-, Food- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als Feinchemikalien/Proteine bezeichnet werden, umfassen unter anderem organische Säuren, sowohl 20 proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, sowie Proteine und Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große Mengen der jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für diese 25 Zweck besonders geeignete Organismen sind coryneforme Bakterien, gram-positive nicht-pathogene Bakterien.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der 30 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie aber auch Sprühtrocknung, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften 35 des Mikroorganismus selbst betreffen.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur 40 Stammverbesserung von Feinchemikalien/Proteine produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Gene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien/Proteine untersucht.

Andere Wege, um ein Verfahren für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu entwickeln, oder die Produktivität eines bereits existierenden Verfahrens für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu erhöhen bzw. zu verbessern, sind die Expression eines oder mehrerer Gene zu erhöhen bzw. zu verändern und oder die Translation einer mRNA durch geeignete Polynukleotidsequenzen zu beeinflussen. Beeinflussung kann in diesem Zusammenhang die Erhöhung, Verringerung, oder auch andere Parameter der Expression von Genen wie zeitliche Expressionsmuster umfassen.

5 Dem Fachmann sind unterschiedliche Bestandteile von bakteriellen Regulationssequenzen bekannt. Man unterscheidet die Bindungstellen von Regulatoren, auch Operatoren genannt, die Bindungstellen von RNA-Polymerase-Holoenzymen, auch –35 und –10 Regionen genannt, und die Bindungsstelle von Ribosomaler 16S-RNA, auch Ribosomale Bindungsstelle oder auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt.

10 Als Sequenz einer Ribosomalen Bindungsstelle, auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt, im Sinne dieser Erfindung werden Polynukleotidsequenzen verstanden, die sich bis zu 20 Basen stromauf des Initiationskodon der Translation befinden.

15 In der Literatur (E. coli und S. typhimurium, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) wird beschrieben, dass sowohl die Zusammensetzung der Polynukleotidsequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz, die Sequenzabfolge der Basen, aber auch der Abstand einer in der Shine-Dalgarno-Sequenz enthaltenen Polynukleotidsequenz zum einen wesentlichen Einfluss auf die Initiationstionsrate der Translation hat.

20 Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität können die Bildung von mRNA auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Promotoren, deren Aktivität unabhängig von der physiologischen Wachstumsphase des Organismus sind, nennt man konstitutiv. Wiederum andere Promotoren reagieren auf externe chemische, wie physikalische Stimuli wie Sauerstoff, Metabolite, Hitze, pH, etc.. Wiederum andere zeigen in unterschiedlichen Wachstumsphasen eine starke Abhängigkeit ihrer Aktivität. Beispielsweise sind in der Literatur Promotoren beschrieben, die während der exponentiellen Wachstumsphase von Mikroorganismen eine besonders ausgeprägte Aktivität zeigen, oder aber auch genau in der stationären Phase des mikrobiellen Wachstums. Beide Charakteristika von Promotoren können für eine Produktion von Feinchemikalien und Proteine je nach Stoffwechselweg einen günstigen Einfluss auf die Produktivität haben.

25 Zum Beispiel kann man Promotoren die während des Wachstums die Expression eines Gens ausschalten, diese aber nach einem optimalen Wachstum anschalten dazu nutzen, ein Gen zu regulieren, das die Produktion eines Metaboliten kontrolliert. Der

30

35

40

veränderte Stamm weist dann die gleichen Wachstumsparameter wie der Ausgangsstamm auf, produziert aber mehr Produkt pro Zelle. Diese Art der Modifizierung kann sowohl den Titer (g Produkt/Liter) als auch die C-Ausbeute (g Produkt/g-C-Quelle) erhöhen.

5

In *Corynebacterium* Spezies konnten bereits solche Nukleotidsequenzen isoliert werden, die für eine Erhöhung bzw. eine Abschwächung der Genexpression genutzt werden können. Diese regulierten Promotoren können die Rate, mit der ein Gen transkribiert wird, abhängig von den internen und/oder externen Bedingungen der Zelle erhöhen oder erniedrigen. Zum Teil kann die Anwesenheit eines bestimmten Faktors, bekannt als Inducer, die Rate der Transkription vom Promotor stimulieren. Inducer können direkt oder aber indirekt die Transkription vom Promotor beeinflussen. Eine andere Klasse von Faktoren, bekannt als Suppressoren ist in der Lage, die Transkription vom Promotor zu reduzieren oder aber zu inhibieren. Wie auch die Inducer, können auch die Suppressoren direkt oder indirekt wirken. Es sind jedoch auch Promotoren bekannt, die über die Temperatur reguliert werden. So kann der Level der Transkription solcher Promotoren zum Beispiel durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur über die normale Wachstumstemperatur der Zelle erhöht oder aber abgeschwächt werden.

10 Eine geringe Anzahl von Promotoren aus *C. glutamicum* wurden bis zum heutigen Tag beschrieben. Der Promotor des Malatsynthase-Gens aus *C. glutamicum* wurde im DE 4440118 beschrieben. Dieser Promotor wurde einem für ein Protein kodierendes Strukturen vorgeschaltet. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneformes Bakterium wird die Expression des dem Promotor nachgeschalteten Strukturen reguliert. Die Expression des Strukturgens wird induziert sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.

20

Reinscheid et al., *Microbiology* 145:503 (1999) haben eine transkriptionelle Fusion zwischen dem pta-ack Promotor aus *C. glutamicum* und einem Reportergen (Chloramphenicol Acetyltransferase) beschrieben. Zellen von *C. glutamicum*, die eine solche transkriptionelle Fusion enthalten, wiesen eine erhöhte Expression des Reportergenes bei Wachstum auf Acetat halftigem Medium auf. Im Vergleich dazu zeigten transformierte Zellen, die auf Glucose wuchsen, keine erhöhte Expression dieses Reportergens.

30

35 In Pa'tek et al., *Microbiology* 142:1297 (1996) wurden einige DNA Sequenzen aus *C. glutamicum* beschrieben, die die Expression eines Reportergens in *C. glutamicum* Zellen verstärken können, beschrieben. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um Consensus-Sequenzen für *C. glutamicum* Promotoren zu definieren.

40

Weitere DNA-Sequenzen aus *C. glutamicum*, die zur Regulation der Genexpression genutzt werden können, sind im Patent WO 02/40679 beschrieben worden. Diese isolierten Polynukleotide stellen Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* dar, die entweder zur Erhöhung oder aber zur Verringerung einer Genexpression ge-
5 nutzt werden können. Weiterhin sind in diesem Patent rekombinante Plasmide be- schrieben, auf denen die Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* mit heterologen Genen assoziiert sind. Die hier beschrieben Methode , Fusion von einem Promotor aus *Corynebakterium glutamicum* mit einem heterologen Gen, kann unter an- derem zur Regulation der Gene der Aminosäurebiosynthese eingesetzt werden.

10

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde weitere Promotoren und/oder Expressions- einheiten mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

15

Demgemäß wurde gefunden, dass man Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthal- tend

20

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleo- tiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nuklein- säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 un- ter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

25

zur Transkription von Genen verwenden kann.

30

Unter „Transkription“ wird erfindungsgemäß der Prozess verstanden, durch den aus- gehend von einer DNA-Matrize ein komplementäres RNA-Molekül hergestellt wird. An diesem Prozess sind Proteine wie die RNA-Polymerase sogenannte Sigma-Faktoren und transkriptionelle Regulatorproteine beteiligt. Die synthetisierte RNA dient dann als Matrize im Prozess der Translation, der dann zum biosynthetisch aktiven Protein führt.

35

Die Bildungsrate, mit der ein biosynthetisch aktives Protein hergestellt wird, ist ein Pro- dukt aus der Rate der Transkription und der Translation. Beide Raten können erfin- dungsgemäß beeinflusst werden und damit die Rate der Bildung von Produkten in ei- nem Mikroorganismus beeinflussen.

Unter einem „Promotor“ oder einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure, die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.

- 5 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator
- 10 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.
- 15
- 20

Unter „Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA, also die Transkriptionsrate verstanden.

- 25 Unter „spezifischer Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA pro Promotor verstanden.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsmikroorganismus verstanden.

- 30 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Mikroorganismus" der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.
- 35 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Mikroorganismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Veränderung oder Verursachung der Promotoraktivität oder Transkriptionsrate, für die Veränderung oder Verursachung der Expressionsaktivität oder Expressionsrate und für die Erhöhung des Gehalts an biosynthetischen Produkten jeweils ein Referenzorganismus

verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Referenzorganismus Corynebakterium glutamicum ATCC 13032.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Ausgangsmikroorganismen verwendet die bereits in der Lage sind, die gewünschte Feinchemikalie herzustellen. Besonders bevorzugt sind dabei unter den besonders bevorzugten Mikroorganismen der Bakterien der Gattung Corynebacterien und den besonders bevorzugten Feinchemikalien L-

10 Lysin, L-Methionin und L-Threonin, diejenigen Ausgangsmikroorganismen die bereits in der Lage sind, L-Lysin, L-Methionin und/oder L-Threonin herzustellen. Dies sind besonderes bevorzugt Corynebakterien bei denen beispielsweise das Gen kodierend für eine Aspartokinase (ask-Gen) dereguliert ist oder die feed-back-Inhibierung aufgehoben oder reduziert ist. Beispielsweise weisen solche Bakterien im ask-Gen eine Mutation auf, die zu einer Reduzierung oder Aufhebung der feed-back-Inhibierung führen, wie beispielsweise die Mutation T311I.

15

Bei einer „verursachten Promotoraktivität“ oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung einer RNA verursacht, die im Wildtyp so nicht vorhanden war.

20 Bei einer veränderten Promotoraktivität oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge der RNA verändert.

25

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

30 Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Promotoraktivität des endogenen erfindungsgemäßen Promoters, beispielsweise durch Mutation des Promoters oder durch Stimmulierung oder Hemmung des Promoters erfolgen.

35 Weiterhin kann die erhöhte Promotoraktivität oder Transkriptionsrate beispielsweise durch Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität erreicht werden, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

40 Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäu-

ren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität dadurch erreicht, dass man eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthalten

A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder

B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die Promotorsequenz des GroES Chaperonin (Pgro) aus Corynebakterium glutamicum dar. SEQ. ID. NO. 1 entspricht der Promotorsequenz des Wildtyps..

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist.

Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Promotoren lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Daten-

banken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 1 leicht auffinden.

Künstliche erfindungsgemäße Promotor-Sequenzen lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch
5 Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Deletion“ ist das Ersetzen eines Nukleotides durch eine direkte Bindung. Insertionen sind Einfügungen
10 von Nukleotiden in die Nukleinsäuresequenz, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Nukleotide ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch
15 Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

20 Multiple alignment parameter:
Gap opening penalty 10
Gap extension penalty 10
Gap separation penalty range 8
Gap separation penalty off
25 % identity for alignment delay 40
Residue specific gaps off
Hydrophilic residue gap off
Transition weighing 0

30 Pairwise alignment parameter:
FAST algorithm on
K-tuplesize 1
Gap penalty 3
Window size 5
35 Number of best diagonals 5

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, ins-

besondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Promotoren weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO.

5 1 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

Weitere natürliche Beispiele für Promotoren lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der 10 Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, 15 enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

20 Die Hybridisierung erfolgt erfinnungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

25 Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (ph7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextranulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte 30 Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische Promotoraktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

35 Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Promotoraktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevorzugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Promotoraktivität der Ausgangssequenz aufweist.

40

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform A), B) oder C) beschriebenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität verstanden. Vorzugsweise weisen diese Fragmente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12,15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz

5 SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 als Promotor, d.h. zur Transkription von Genen.

10 Die SEQ. ID. NO. 1 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 beschrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität.

15 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend

20 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

Alle vorstehend erwähnten Nukleinsäuren mit Promotoraktivität sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie
30 beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-
35 Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

40 Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell

verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.

Unter einer Expressionseinheit wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, also eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder Gens, die Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert.

Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Expressionseinheit und einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulatoriver Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Expressionseinheitssequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Expressionseinheitssequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Unter „Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein, also die Expressionsrate verstanden.

Unter „spezifischer Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein pro Expressionseinheit verstanden.

Bei einer „verursachten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung eines Proteins verursacht, das im Wildtyp so nicht vorhanden war.

Bei einer „veränderten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge des Proteins verändert.

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität

5 der endogenen Expressionseinheit, beispielsweise durch Mutation der Expressionseinheit oder durch Stimmulierung oder Hemmung der Expressionseinheit erfolgen.

Weiterhin kann die erhöhte Expressionsaktivität oder Expressionsrate beispielsweise durch Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität erreicht werden, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus

15 durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität dadurch erreicht, dass man

eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

25 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, enthalten eine erfindungsgemäße, vorstehend beschriebene Nukleinsäure mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 42 als ribosomale Bindungsstelle.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Expressionseinheit:

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

10 Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Nukleinsäuresequenz der Expressionseinheit des GroES Chaperonin (Pgro) aus Corynebakterium glutamicum dar. SEQ. ID.NO. 2 entspricht der Sequenz der Expressionseinheit des Wildtyps.

15 20 Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionseinheiten, enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Expressioneinheiten lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

30 Künstliche erfindungsgemäße Sequenzen der Expressionseinheiten lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

35 40 Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Expressionseinheiten weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

5

Weitere natürliche Beispiele für Expressionseinheiten lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise

10 leicht auffinden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionseinheiten, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 15 10, bevorzugt mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotid(e).

Unter "hybridisieren" versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während 20 unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

25

Die Hybridisierung erfolgt erfinnungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (ph7,6), 5x 35 Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

Die erfinnungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen ferner die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Mikroorganismen verwendbar sind. Solche Sonden

bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringen-ten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfin-dungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges

5 hybridisiert.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eins speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz

10 verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Expressionseinheiten, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische
15 Expressionsaktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Expressionsaktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevor-zugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Expressionsaktivität der Aus-
20 gangssequenz aufweist.

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform E), F) oder G) beschriebenen Expressionseinheiten verstanden. Vorzugsweise weisen diese Frag-mente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevor-
25 zugt mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 als Expressionseinheit, d.h. zur Expression von Genen.

30 Die SEQ. ID. NO. 2 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 be-schrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten.

35 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend eine erfin-dungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

40 Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- 5 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten umfassen ein oder mehrere der folgenden genetischen Elemente: eine Minus 10 (" -10 ") Sequenz; eine Minus 35 (" -35 ") Sequenz; einen Transkriptionsstart, eine Enhancer Region; und eine Operator Region.

15 Vorzugsweise sind diese genetischen Elemente spezifisch für die Spezies Corynebakterien, speziell für *Corynbacterium glutamicum*.

Alle vorstehend erwähnten Expressionseinheiten sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

20 25 30 35 40 Für die Erfindungen in diesem Patent wurden Methoden und Techniken genutzt, die dem Fachmann, der in mikrobiologischen und rekombinanten DNA-Techniken geübt ist, bekannt sind. Methoden und Techniken für das Wachstum von Bakterienzellen, das Einschleusen von isolierten DNA-Molekülen in die Wirtszelle, und die Isolierung, Klönerung und Sequenzierung von isolierten Nukleinsäuremolekülen usw. sind Beispiele für solche Techniken und Methoden. Diese Methoden sind in vielen Standardliteraturstellen beschrieben: Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer and P. Berg, Genes & Genomes, University Science Books, Mill Valley, California

(1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Kearny, *Molecular Genetics of Escherichia coli*, The Guilford Press, New York, NY (1989).

Alle Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in Form eines isolierten Nukleinsäuremoleküls vor. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise besonders vorteilhaft in verbesserten Verfahren zur fermentativen Herstellung von biosynthetischen Produkten wie nachstehend beschrieben verwenden.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie in Mikroorganismen durch Stress induziert werden. Durch geeignete Steuerung des Fermentationsprozesses lässt sich diese Stress-Induktion gezielt für eine Erhöhung der Transkriptions/Expressionsrate gewünschter Gene steuern. Insbesondere bei der Produktion von L-Lysin wird diese Stressphase sehr früh erreicht, so dass hier sehr früh eine erhöhte Transkriptions/Expressionsrate von gewünschten Genen erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zur Regulation und Verstärkung der Bildung von verschiedenen biosynthetischen Produkten, wie beispielsweise Feinchemikalien, Proteinen, insbesondere Aminosäuren, in Mikroorganismen, insbesondere in Corynebacterium species dienen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 10 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 15 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform a) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Promotoraktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Promotoraktivität kann dadurch erreicht werden, dass Nukleotide in der Bindungsstelle des RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -10-Region und -35 Region bekannt) ausgetauscht werden. Weiterhin dadurch dass der Abstand der beschriebenen RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen zueinander durch Deletionen von Nukleotiden oder Insertionen von Nukleotiden verkleinert oder vergrößert werden. Weiterhin dadurch dass Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -Operatoren bekannt) für Regulatiorproteine (dem Fachmann bekannt als Repressoren und Aktivatoren) in räumliche Nähe an die Bindungsstellen des RNA-Polymerase-Holoenzymes gebracht werden, dass diese Regulatoren nach Bindung an eine Promotor-Sequenz die Bindung des und Transkriptionsaktivität des RNA-Polymerase-Holoenzymes abschwächen oder verstärken, oder auch unter einen neuen regulatorischen Einfluss stellen.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 stellt vorzugsweise die ribosomale Bindungsstelle der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die Sequenz SEQ. ID. NO. 52 die -10-Region der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten dar. Veränderungen

der Nukleinsäuresequenz in diesen Regionen führen zu einer Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO.

5 53 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium ermöglichen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO

10 52 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium ermöglichen.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. als ribosomale Bindungsstelle verwendet .

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region verwendet.

In Bezug auf die „spezifische Promotoraktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität des Wildtyps, 25 also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 1 verstanden.

Gemäß Ausführungsform b) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße 30 Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man
35

b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, er-

folgt oder

5 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Es ist somit möglich, die Transkriptionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

15 gemäß Ausführungsform b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere endogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, endogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende endogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Transkriptionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

30 35 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, exogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Pro-

motoraktivität, erfolgt oder

Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform b2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform b3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal. Eine „chromosomale“ Integration ist die Insertion eines exogenen DNA-Fragmentes in das Chromosom einer Wirtszelle. Dieser Begriff wird auch für die homologe Rekombination zwischen einem exogenen DNA-Fragment und der entsprechenden Region auf dem Chromosom der Wirtszelle genutzt.

In Ausführungsform b) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform b), wie in Ausführungsform a) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

Unter „endogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die bereits im Wildtypgenom enthalten sind.

Unter „exogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die im Wildtypgenom nicht enthalten sind.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf Regulation der Transkription durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen zu transkribierenden Bereich, also beispielsweise einen Bereich der die Translation reguliert, einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls weitere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf die nachstehend beschriebene Regulation der Expression durch die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls wei-

tere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter einem „kodierenden Bereich“ wird eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die ein Protein kodiert.

5

Unter „heterolog“ in Bezug auf Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität transkribiert werden, sondern das eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Nukleinsäure mit Promotoraktivität und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

10

Unter „heterolog“ in Bezug auf Expressionseinheiten und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten exprimiert werden, sondern das eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Expressionseinheit und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

15

20 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

25

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität , die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

30

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) dadurch erreicht wird, dass man

40

bh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer en-

dogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

5 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

20 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

25 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

30 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

35 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder

 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform c) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Expressionsaktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Beispielsweise führt die Verlängerung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem translationellen Startcodon in der Regel zu einer Änderung, einer Verkleinerung oder aber auch einer Verstärkung der spezifischen Expressionsaktivität. Eine Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität kann auch dadurch erreicht werden, dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region (Ribosomale Bindungsstelle) in seinem Abstand zum translationellen Startcodon durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entweder verkürzt oder verlängert wird. Aber auch dadurch dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region so verändert wird, dass die Homologie zu komplementären 3' Seite 16S rRNA entweder verstärkt oder aber auch verringert wird.

In Bezug auf die „spezifische Expressionsaktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Expressionseinheit des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 2 verstanden.

Gemäß Ausführungsform d) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

- 30 d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- 35 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

Es ist somit möglich, die Expressionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

gemäß Ausführungsform d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Expressionssrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende, exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform d2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

40

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform d3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal.

5 Die Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch als Expressionskassetten bezeichnet.

In Ausführungsform d) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform d), wie in Ausführungsform d) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

10 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

15 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

20 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

25 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) dadurch erreicht, dass man

30 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenen-

falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

5 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

10 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

15 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von

30 proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren

35 kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gege-

benenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

In einer besondere bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

- 5 Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

Bevorzugte Proteine und Nukleinsäuren kodierend diese Proteine der vorstehend beschriebenen Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind Proteinsequenzen bzw. Nukleinsäuresequenzen mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, bevorzugt aus coryneformen Bakterien, besonders bevorzugt aus *Corynebakterium glutamicum*.

Beispiele für besonders bevorzugte Proteinsequenzen und die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, deren Bezugsdokument, sowie deren Bezeichnung im Bezugsdokument sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Protein	Nukleinsäure kodierend	Bezugs-dokument	SEQ. ID. NO. im Bezugsdoku-
---------	------------------------	-----------------	-----------------------------

	Protein		ment
Aspartatkinase	ask oder lysC	EP1108790	DNA: 281 Protein: 3781
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Protein: 3831
Dihydrodipicolinate-Synthetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Protein: 56
Dihydrodipicolinate-Reduktase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Protein: 36
Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Protein : 6944
Diaminopicolinat-Decarboxylase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.: 6951
Lysin-Exporter	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginyl-t-RNA Synthetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Phosphoglycerat-kinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Pyruvat-Carboxylase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Triosephosphat-Isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotin-Ligase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxylase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserin Kinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Threonin Synthase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Threonin Export Carrier	thrE	WO 0251231	DNA: 41

			Prot.: 42
Threonin Efflux Protein	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Threonin Dehydratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserin-O-Acetyltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot: 4227
Cystathionin-gamma-synthase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot: 6991
Cystathionin-beta-Lyase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot: 6035
Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, -	metH	EP 1108790	DNA: 1663 Prot: 5163
O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot: 4226
Methylentetrahydrofolat-Reduktase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot: 5879
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot: 4915
Phosphoserin-Phosphatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Phosphoserin-Phosphatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot: 3967
Phosphoserin-Phosphatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Phosphoserin-Aminotransferase	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serin Acetyl-Transferase	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cystein-Synthase I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cystein Synthase II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserin-Dehydrogenase	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756

Serin-Hydroxymethyltransferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase	CysH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin-Sulfit-Reduktase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP Reduktase	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Transkriptioneller Regulator LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Protein: 298
Transkriptioneller Regulator LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Protein: 4176
Transkriptioneller Regulator LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Protein: 6728
Transkriptioneller Regulator LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Protein: 5700
Malat-Quinon-Oxidoreduktase	mqa	WO 0100844	DNA: 569 Protein: 570
Transketolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Phosphofructokinase 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 Protein: 56
1-Phosphofructokinase 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 Protein: 58
6-Phosphofructokinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Protein: 4883

6-Phosphofructokinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Protein: 2
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Protein: 4636
Pyruvat Oxidase	poxB	WO 0100844	DNA: 85 Protein: 86
RXA00655-Regulator	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulator	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6-phosphogluconolactonase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz der Fructose-1,6-bisphosphatase 2, oder auch fbr2 genannt, (SEQ. ID. NO. 51) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend eine Fructose-1,6-bisphosphatase 2 (SEQ. ID. NO. 50).

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz des Proteins in Sulfat-Reduktion, oder auch RXA077 genannt, (SEQ. ID. NO. 4) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend ein Protein in Sulfat-Reduktion (SEQ. ID. NO. 3)

Weitere besonders bevorzugte Proteinsequenzen aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, weisen jeweils die in Tabelle 1 für dieses Protein angegebene Aminosäuresequenz auf, wobei das jeweilige Protein jeweils an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte2 für diese Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäurepositionen eine andere proteinogene Aminosäure aufweist als die jeweilige in Tabelle2/Spalte3 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform, weisen die Proteine an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte 2 für die Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle2/Spalte4 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure auf. Es handelt sich bei den in Tabelle 2 angegebenen Proteine um mutierte Proteine des Biosyntheseweges von Aminosäuren, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und sich deshalb insbesondere zur Expression der entsprechenden Nukleinsäuren durch den erfinungsgemäß Promotor und zur Herstellung von Aminosäuren eignen. Beispielsweise führt die Mutation T311I zu

einem Ausschalten der feedback-Inhibierung von ask.

Die entsprechenden Nukleinsäuren, die ein vorstehend beschriebenes mutiertes Protein aus Tabelle 2 kodieren, lassen sich durch übliche verfahren herstellen.

5

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen kodierend ein mutiertes Protein eignet sich beispielsweise das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist oder die in Tabelle 1 in Bezug genommenen Nukleinsäuresequen-

10 zonen. Für die Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine in die Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine ist es vorteilhaft, die codon usage desjenigen Organismus zu verwenden, in den die Nukleinsäuresequenz eingebracht werden soll oder in der die Nukleinsäuresequenz vorliegt. Beispielsweise ist es vorteilhaft für *Corynebakterium glutamicum* die codon usage von *Corynebakterium glutamicum* zu verwenden. Die codon usage des jeweiligen Organismus lässt sich in an sich bekannter Weise aus Datenbanken oder Patentanmeldungen ermitteln, die zumindest ein Protein und ein Gen, das dieses Protein kodiert, aus dem gewünschten Organismus beschreiben.

20 20 Die Angaben in Tabelle 2 sind folgendermassen zu verstehen:

In Spalte 1 "Identifikation" wird eine eindeutige Bezeichnung für jede Sequenz in Bezug auf Tabelle 1 aufgeführt.

25 25 In Spalte 2 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der entsprechenden Polypeptidsequenz aus Tabelle 1. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

30 30 In Spalte 3 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm der Sequenz aus Tabelle 1.

35 35 In Spalte 4 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 5 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

40

Für ein mutiertes Protein mit einer bestimmten Funktion (Spalte 5) und einer bestimmten Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1) werden in den Spalten 2,3 und 4 mindestens eine Mutation, bei einigen Sequenzen auch mehrere Mutationen beschrieben. Diese mehreren Mutationen beziehen sich immer auf die jeweils

5 obenstehende, nächstliegendste Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1). Unter dem Begriff „mindestens eine der Aminsäurepositionen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz wird vorzugsweise mindestens eine der für diese Aminosäuresequenz in Spalte 2, 3 und 4 beschriebenen Mutationen verstanden.

10 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

- A Alanin
- C Cystein
- D Aspartat
- 15 E Glutamat
- F Phenylalanin
- G Glycin
- H His
- I Isoleucin
- 20 K Lysin
- L Leucin
- M Methionin
- N Asparagin
- P Prolin
- 25 Q Glutamin
- R Arginin
- S Serin
- T Threonin
- V Valin
- 30 W Tryptophan
- Y Tyrosin

Tabelle 2

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Identifikation	AS Position	AS Wildtyp	AS Mutante	Funktion
ask	317	S	A	Aspartatkinese
	311	T	I	
	279	A	T	

asd	66	D	G	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihydrodipicolinat Synthetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihydrodipicolinat-Reduktase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinat-Decarboxylase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginyl-t-RNA-Synthetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
pycA	7	S	L	Pyruvat-Carboxylase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	

	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxylase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserin Kinase
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Threonin Synthase
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Threonin-Eflux Protein
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserin-Deydrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	transkriptioneller Regulator LysR1
lysR3	142	R	W	transkriptioneller Regulator LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transketolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartat-1-Decarboxylase
	33	G	S	6- Phosphogluconolactonase

In den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sowie den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von

5 genetisch veränderten Mikroorganismen, den nachstehend beschriebenen genetisch veränderten Mikroorganismen und den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten erfolgt das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, der vorstehend beschriebenen Gene und der vorstehend beschriebenen Nuk-

10 leinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus, insbesondere in corynefome Bakterien, vorzugsweise durch die SacB-Methode.

Die SacB-Methode ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73 und Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57 beschrieben.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäßen Expressionseinheiten in den Mikroorganismus.

25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen

30 der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus.

Die Erfindung betrifft daher ferner eine Expressionskassette, umfassend

35 mindestens eine erfindungsgemäße Expressionseinheit

mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, also ein zu exprimierendes Gen und

gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wie beispielsweise einen Terminator,

wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

Vorzugsweise ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

10 Besonders bevorzugt ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren

15 20 25

kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen.

Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend und deren Beispiele in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

In den erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist die physikalische Lage der Expressionseinheit relativ zum zu exprimierenden Gen so gewählt, daß die Expressionseinheit die Transkription und vorzugsweise auch die Translation des zu exprimierenden Gens reguliert und damit die Bildung eines oder mehrerer Proteine ermöglicht. Die "Bildung ermöglichen" beinhaltet dabei die konstitutive Steigerung der Bildung, Abschwächung bzw. Blockierung der Bildung unter spezifischen Bedingungen und oder die Steigerung der Bildung unter spezifischen Bedingungen. Die "Bedingungen" umfassen dabei: (1) Zugabe einer Komponente zum Kulturmedium, (2) Entfernen einer Komponente vom Kulturmedium, (3) Austausch einer Komponente im Kulturmedium durch eine zweite Komponente, (4) Erhöhung der Temperatur des Kulturmediums, (5) Erniedrigung der Temperatur des Kulturmediums, und (6) Regulierung der atmosphärischen Bedingungen, wie z.B. die Sauerstoff- oder Stickstoffkonzentration, in der das Kulturmedium gehalten wird.

Die Erfindung betrifft ferner einen Expressionsvektor enthaltend eine vorstehend beschriebene, erfindungsgemäße Expressionskassette.

Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Plasmide eignen sich solche besonders bevorzugt, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/ Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), Bernhard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Duncan und Shivnan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptions-

rate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die
5 Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität
10 heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

20 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Ge-

nen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

10 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

30 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

35 br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten

Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

5 te mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

10 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

15 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

20 20 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25 25 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30 30 d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei,

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

35 dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Express-

sionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

5 Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu eprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

10 Besonders bevorzugt enthält dieser genetisch veränderte Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Expressionskassette.

15 Besonders bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung gentisch veränderte Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvектор oder Plasmidvektor, der wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Konklenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

30 35 Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-
40 Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkri-

tioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Deydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-

5 Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II

10 Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

15

Besonders bevorzugte Beispiele der Proteine und Gene aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.

Bevorzugte Mikroorganismen oder genetisch veränderte Mikroorganismen sind Bakterien, Algen, Pilze oder Hefen.

25 Besonders bevorzugte Mikroorgansimen sind insbeondere coryneforme Bakterien.

Bevorzugte coryneforme Bakterien sind Bakterien der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* und *Corynebacterium efficiens* oder der Gattung *Brevibacterium*, insbesondere der Arten *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* und *Brevibacterium divaricatum*.

35 Besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium efficiens* DSM 44548. *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium davarica-*

tum ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Mit der Abkürzung KFCC ist die Korean Federation of Culture Collection gemeint, mit
5 der Abkürzung ATCC die American type strain culture collection, mit der Abkürzung
DSM die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Weitere besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind in Tabelle 3 aufgelistet:

10

Bakterium								Hinterlegungsnummer	
Genus	species	ATCC	FERMI	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							

Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum				11160				
Brevibacterium	spec.					717.73			
Brevibacterium	spec.					717.73			
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872					2399		
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujikense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							

Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							

Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum		B8183						
Corynebacterium	glutamicum		B8182						
Corynebacterium	glutamicum		B12416						
Corynebacterium	glutamicum		B12417						
Corynebacterium	glutamicum		B12418						
Corynebacterium	glutamicum		B11476						
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrophilus	21419			11594				
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

5 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

10 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

15 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten ist es mit Hilfe der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren möglich in den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen die Stoffwechselwege zu spezifischen biosynthetischen Produkten zu regulieren.

20 Dazu werden beispielsweise Stoffwechselwege die zu einem spezifischen biosynthetischen Produkt führen durch Verursachung oder Erhöhung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses Biosyntheseweges verstärkt in dem die erhöhte Proteinmenge zu einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Proteine des gewünschten

25 Biosyntheseweges und damit zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

Weiterhin können Stoffwechselwege die von einem spezifischen biosynthetischen Produkt wegführen durch Reduzierung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von

30 Genen dieses wegführenden Biosyntheseweges abgeschwächt werden in dem die reduzierte Proteinmenge zu einer reduzierten Gesamtaktivität dieser Proteine des unerwünschten Biosyntheseweges und damit zusätzlich zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen sind beispielsweise in der Lage aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol biosynthetische Produkte herzustellen.

40 Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganis-

men.

Je nach gewünschtem biosynthetischen Produkt muss die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate verschiedener Gene erhöht bzw. reduziert werden. In der Regel ist es

5 vorteilhaft die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate mehrere Gene zu verändern, d.h. die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu erhöhen und/oder die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu reduzieren.

10 In den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen ist mindestens eine veränderte, dass heißt erhöhte oder reduzierte Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate eines Gens auf eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäße Expressionseinheit zurückzuführen.

15 Weitere, zusätzliche veränderte, d.h. zusätzlich erhöhte oder zusätzlich reduzierte Transkriptionsraten bzw. Expressionsraten von weiteren Genen im genetisch veränderten Mikroorganismus können, müssen aber nicht auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zurück gehen.

20 Die Erfindung betrifft deshalb weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganismen.

25 Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Feinchemikalien.

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Verbindungen, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische

30 Industrie, die Landwirtschafts-, Kosmetik, Food und Feed-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie beispielsweise Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Ku-ninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology

35 Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propan-diol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27,

40 "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und

Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und 5 sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10 **I. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen**

Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, 15 dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren 20 gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen findet. Biosynthese- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, 25 Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet. 30

Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie 35 40 auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan

werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pentosephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea

Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese benötigten Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-

5 Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Amino-

10 säure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

II. Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutika-Metabolismus sowie Verwendungen

Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen.

15 Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben

20 neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt

25 und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutraceutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder

30 anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutraceutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

35 Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and

40

Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- 5 Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B6" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin,
- 10 Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxin-hydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthenat (Pantothenäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Panthenat-Biosynthese bestehen aus
- 15 der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Panthenäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Panthenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Panthenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von
- 20 Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Panthenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des

- 30 α-Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoësäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-
- 35 Aminobenzoësäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.

Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch

- 40 nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der betei-

lignen Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

5

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelierte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

10

III. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

15 Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die 20 RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, lässt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

25

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

30 Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflußt wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin-

35

40

und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden 5 gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus 10 beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42, 15 Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide 20 werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für 25 viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschritt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukleotides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

IV. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

35 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α,α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610; 40 Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und

Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

5

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe organische Säuren, Proteine, Nukleotide und Nukleoside, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, Enzyme und Proteine.

10

Bevorzugte organische Säuren sind Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure

Bevorzugte Nukleoside und Nukleotide sind beispielsweise beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6,

15

Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten.

20

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind weiterhin Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, Diole wie beispielsweise Propandiol und Butandiol, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Hyaluronsäure und Trehalose, aromatische Verbindungen, wie beispielsweise aromatische Amine, Vanillin und Indigo, Vitamine und Cofaktoren, wie beispielsweise beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane et al. (1998) Science 282: 63-68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien.

30

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind Aminosäuren, besonders bevorzugt essentielle Aminosäuren, insbesondere L-Glycin, L-Alanin, L-leucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Cystein, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Arginin, L-Asparagin, L-

35

Asparaginsäure und L-Threonin, L-Homoserin, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin. Im folgenden wird unter einer Aminosäure, wie beispielsweise Lysin, Methionin und Threonin, sowohl jeweils die L- und die D-Form der Aminosäure, vorzugsweise die L-Form, also beispielsweise L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin verstanden.

40

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

- 5 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 10 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,
- 15 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-
- 20 Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Deydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend
- 25 eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

- 35 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-

bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 10 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydridipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Deydrogease-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogease-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 30 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-

Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

10 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

15 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

20 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-

25 Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-

30 Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-TransferaseNukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität

35 II , Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren

40 kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine

Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend eine, RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

5

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

10

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität,

30

mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-

35

beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serine Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase-Aktivität, Cystein-Synthase II -Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-

40

Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und

5 Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzier-

10 te Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

15 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

20 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

25 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

30 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

35 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin

40 Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren

kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin-Exporter,

5 Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Op_{cA} Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-

10 Dehydrogenase

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

15 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketola-

se-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionsseinheit verursacht sein.

Unter dem Begriff der „Aktivität“ eines Proteins wird bei Enzymen die Enzymaktivität des entsprechenden Proteins, bei anderen Proteinen, beispielsweise Struktur oder Transport-Proteinen die physiologische Aktivität der Proteine verstanden.

Die Enzyme sind in der Regel in der Lage ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln bzw. diesen Umwandlungsschritt zu katalysieren.

Dementsprechend wird unter der „Aktivität“ eines Enzyms die in einer bestimmten Zeit durch das Enzym umgesetzte Menge Substrat bzw. gebildete Menge Produkt verstanden.

Bei einer erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat

bzw. die gebildete Menge Produkt erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der „Aktivität“ bei allen vorstehend und nachstehend beschriebenen Aktivitäten mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %,
5 weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der „Aktivität des Wildtyps“.

Bei einer reduzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum
10 Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat bzw. die gebildete Menge Produkt reduziert.

Unter einer reduzierten Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität dieses Enzyms in einem Mikroorganismus verstanden.
15

Eine Reduzierung der Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Enzyms bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Enzyms (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Enzyms). Vorzugsweise wird die Aktivität im Mikroorganismus im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständige Fehlen der entsprechenden Aktivität.
20
25

Die Aktivität bestimmter Enzyme in genetisch veränderten Mikroorganismen sowie im Wildtyp und damit die Erhöhung oder Reduzierung der Enzymaktivität lassen sich nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise Enzymassays ermitteln.
30

Beispielsweise wird unter einer Pyruvatcarboxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Pyruvat in Oxaloacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter einer Pyruvatcarboxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase umgesetzte Menge Pyruvat bzw. gebildete Menge Oxaloacetat verstanden.
35

Bei einer erhöhten Pyruvatcarboxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase 40 die umgesetzte Menge Pyruvat bzw. die gebildete Menge Oxaloacetat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Pyruvatcarboxylase -Aktivität des Wildtyps.

Weiterhin wird beispielsweise unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die Enzymaktivität einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verstanden.

10 Unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Oxaloacetat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. gebildete Menge Phosphoenolpyruvat verstanden.

Bei einer reduzierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. 20 die gebildete Menge Phosphoenolpyruvat reduziert.

Eine Reduzierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (d.h. 25 fehlende Nachweisbarkeit von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Vorzugsweise wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase - 30 Aktivität.

Die zusätzliche Erhöhung von Aktivitäten kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen 35 auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Gens durch Aktivatoren oder wie 40

vorstehend beschrieben durch Erhöhung der Promotoraktivität oder Erhöhung der Expressionsaktivität oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien in den Mikroorganismus.

5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend ein Protein wird erfundungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Mikroorganismus eigenen, endogenen Proteine verstanden.

Dies kann beispielsweise, wie vorstehend beschrieben durch Veränderung der Promotor- und/oder Expressionseinheits-Sequenzen der Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Proteine durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Zur Erzielung einer Erhöhung der Genexpression kann der Fachmann weitere unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-40 10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195

(1998)), bei Makrides (*Microbiological Reviews* 60 : 512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Weiterhin kann es für die Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-
5 Lysin, L-Methionin und L-Threonin, vorteilhaft sein, neben der Expression bzw. Ver-
stärkung eines Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:
"Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: *Overproduction of Microbial*
Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer
Nukleinsäure kodierend eines der vorstehend beschriebenen Proteine durch Einbrin-
gen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein entsprechendes Protein in den
Mikroorganismus. Das Einbringen der Nukleinsäure kann chromosomal oder extrachro-
mosomal erfolgen, also durch Erhöhung der Kopienzahl auf dem Chromosom und oder
15 eine Kopie des Gens auf einem sich replizierenden Plasmid in dem Wirtsmikroorga-
nismus.

Vorzugsweise erfolgt das Einbringen der Nukleinsäure, beispielsweise in Form einer
20 Expressionskassette, enthaltend die Nukleinsäure, chromosomal, insbesondere durch
die vorstehend beschriebene SacB-Methode.

Dazu kann prinzipiell jedes Gen, das eines der vorstehend beschriebenen Proteine
kodiert verwendet werden.

25 Bei genomischen Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns
enthalten, sind für den Fall das der Wirtsmikroorganismus nicht in der Lage ist oder
nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren,
bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden
cDNAs zu verwenden.

30 Beispiele für die entsprechenden Gene sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der vorstehend beschriebenen Aktivitäten in
Mikroorganismen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

35

- Einbringen mindestens einer sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion ei-
ner Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressi-
onskassette

- Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen das entsprechende -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette

5 • Einbringen mindestens einer den RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

10 • Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in das gewünschte Zielgen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleaseen gegen das Zielgen generiert werden.

15 • Einbringen eines Promotors mit reduzierter Promotoraktivität oder einer Expressionseinheit mit reduzierter Expressionsaktivität.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Reduzierung seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante eines Proteins oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

25 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität eines Proteins bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des Proteins, des Transports des Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des
30 RNA-Spleißens, Induktion eines RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Mikroorganismen ein
35 Isolieren von biosynthetischen Produkten aus den Mikroorganismen oder/oder aus der Fermentationsbrühe angeschlossen. Diese Schritte können gleichzeitig und/oder vorzugsweise nach dem Kultivierungsschritt stattfinden.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich
40 oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulauf-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmödium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmödien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Celulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen

Als Schwefelquelle für die Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

5

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

10 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch
15 andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen bei-
spielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyri-
doxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Me-
diendatenkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem
Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue
20 Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab
und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Me-
diendatenoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A
Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73,
ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbie-
25 tern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und der-
gleichen.

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und
121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zu-
30 sammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten
können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder char-
genweise hinzugegeben werden.

Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise
35 bei 25°C bis 40°C und kann während des Experiments konstant gehalten oder verän-
dert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise
um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zu-
gabe von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak
bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefel-
40 säure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel,

wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die

5 Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

10 Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren

15 wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die Isolierung von biosynthetischen Produkten aus der Fermentationsbrühe und/oder den Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise entsprechend den physikalisch-chemischen Eigenschaften des biosynthetischen Wertprodukts und den biosynthetischen Nebenprodukten.

20

Die Fermentationsbrühe kann anschließend beispielsweise weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.

25

Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers,

30 durch Umkehrsmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.

35 Es ist aber auch möglich die biosynthetischen Produkte, insbesonder L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produkthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder ande-

40

re Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

5

Die biosynthetischen Produkte können in unterschiedlichen Formen anfallen, beispielsweise in Form ihrer Salze oder Ester.

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des

10 Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-
Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren,
Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese
Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Micro-
biol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al.
15 (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry
(1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-
581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry
and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of
HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biol-
20 ogy, Bd. 17.

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher beschrieben:

25 Beispiel 1

Herstellung eines Integrationsplasmids zur Überexpression des pycA-Gens mit Hilfe der heterologen Expressionseinheit Pgro (SEQ ID 2)

30 Zur Amplifizierung des Promoters des Gens, das für das Chaperonin Gro ES kodiert,
wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ. ID. NO 5:

gro3: 5'-gccgcagcaaaccaggtag -3'

35 SEQ. ID. NO. 6:

gro11: 5'- agtcgacacgatgaatccctccatgagaaaa-3'

40 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 427 bp entsprach.

Zur Amplifizierung eines Teils des Gens, das für das Pyruvat-Carboxylase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

5 SEQ. ID. NO. 7:

pyc6: 5'- ttttctcatggagggattcatcggtcgactcacacatcttaacgcttccag-3'

SEQ. ID. NO. 8:

pyc3: 5'- cccgcagcaacgcacgcaagaaa-3'

10

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1344 bp entsprach.

15 Die Primer gro11 und pyc6 enthalten eine überlappende Sequenz und sind an ihren 5'-Enden homolog zueinander.

Die oben erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die folgenden Primer genutzt wurden.

20 SEQ. ID. NO. 9:

gro12: 5'- gcattcgcgccgctcgtaacta-3'

SEQ. ID. NO. 10:

pyc11: 5'- ggttcccgccgcctggtaa-3'

25

Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1107 bp entsprach. Diese Pgro/pycA-Fusion wurde dann in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. In einem weiteren Schritt wurde die Fusion Pgro/pycA aus dem Plasmid pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH,

30 Karlsruhe, Deutschland) als 1125 bp EcoRI-Fragment in den Integrationsvektor pK19 mob sacB SEQ ID NO 11 kloniert, der zuvor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pk19 mob sacB Pgro pycA bezeichnet.

Zur Amplifikation eines 5'-Bereiches des pycA-Gens wurden folgende Oligonukleotide definiert:

SEQ. ID. NO. 12:

pyc14: 5'- ccggcgaagtgtctgctcggtga-3'

40 SEQ. ID. NO. 13:

pyc15: 5'- accccgccccagttttc-3'

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 487 bp entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Ein 593 bp Spel/XbaI-Fragment wurde dann anschließend in den Vektor pK19 mob sacB Psod ask kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pK19 mob sacB Pgro pycA + US (SEQ. ID. NO. 14) bezeichnet. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *Escherichia coli* XL-1 Blue (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

Mit dem Transformationsplasmid pK19 mobsacB Pgro pycA + US wurde dann *E. coli* Mn522 (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zusammen mit dem Plasmid pTc15AcglM nach Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 transformiert. Das Plasmid pTc15AcglM ermöglicht die Methylierung von DNA nach dem Methylierungsmuster von *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Durch diesen Schritt wird eine anschließende Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Integrationsplasmid pK19 mob sacB Pgro pycA + US ermöglicht. Aus dieser Elektroporation und der nachfolgenden Selektion auf CM-Platten (10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 10 g/l Hefezucker, 22,0 g/L Agar (Difco)) mit Kanamycin (25 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten.

Zur Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis, das zur Excision des Vectors samt dem pycA-Promoter und dem pycA-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten in CM-Medium über Nacht ohne Kanamycin angezogen und anschließend zur Selektion auf CM-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Vektor pK19 mob sacB vorhandenen sacB-Gen kodiert für das Enzym Laevansucrase und führt bei Wachstum auf Saccharose zur Synthese von Laevan. Da Laevan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum* Zellen, die das Integrationsplasmid durch den zweiten Rekombinationsschritt verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 15 der getesteten Klone konnte neben der Resistenz gegenüber Saccharose auch eine Sensitivität gegenüber Kanamycin nachgewiesen werden. Ob auch der gewünschte Austausch der natürlichen Expressionseinheit durch die Pgro-Expressionseinheit erfolgt war, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Für diese Analyse wurde chromosomal DNA aus dem Ausgangsstamm und den 15 Klonen isoliert. Hierzu wurden die jeweiligen Klone mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl H₂O suspendiert und 10 min bei 95°C aufgekocht. Jeweils 10 µl

der erhaltenen Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die zur Pgro-Expressionseinheit und dem pycA-Gen homolog sind.

5 Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Vorabdenaturierung: 5 min bei 95°C; Denaturierung 30 sec bei 95°C; Hybridisierung 30 sec bei 56°C; Amplifizierung 1 min bei 72°C; 30 Zyklen; End-Extension 5 min bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes konnte durch Wahl der Oligonukleotide kein PCR-Produkt entstehen. Nur bei Klonen, die durch die 2. Rekombination den Austausch der natürlichen Expressionseinheit (PpycA) gegen Pgro vollzogen haben, wurde ein Bande mit einer Größe von 310 bp erwartet. Insgesamt waren von den getesteten 15 Klonen 7 Klonen positiv.

10

Die 7 positiven Klone und der Ausgangsstamm wurden anschließend in 10 ml CM-Medium (10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 15 10 g/l Hefeextrakt) über Nacht angezogen. Anschließend wurde die Zellen pelletiert und in 0,5 ml Puffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl; pH7,7)) aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Ribolyzers (3 x 30 sec bei Stufe 6, Fa. Hybaid). Nach einer Proteinbestimmung mittels der Bradfordmethode wurden jeweils 15 µg Protein auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine aufgetrennt. Im Vergleich zum Ausgangsstamm konnte eine erhöhte Menge an PycA-Protein detektiert werden (Figur 1). Figur 1 zeigt ein 10%iges SDS-Gel der Pgro pycA-Klone.

Beispiel 2

25 Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:15 und SEQ ID NO: 16 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

30

SEQ ID NO:15

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCCGCCGGCCGGCCGGTGTGAAATACCGCACA
G-3'

35 SEQ ID NO:16

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCCCTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC
G-3'

Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer
40 SEQ ID NO:15 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen

Smal, BamHI, Nhel und Ascl und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:16 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, Xhol, NotI und Dral. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

15 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

20 Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:17 und SEQ ID NO:18 eine Kanamycin-Resistenzcassette amplifiziert.

SEQ ID NO:17

25 5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:18:

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

30 Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:17 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, Smal, BamHI, Nhel und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:18 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Ascl und Nhel. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das so erhaltene DNA Fragment wurde mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

35 Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

40

fication Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.

Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease Drai (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.

Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:19 und SEQ ID NO: 20 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.

SEQ ID NO: 19

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO: 20:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGGCCACGC-3'

5

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 19 und SEQ ID NO: 20 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

20 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

25 Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die bei-
30 de synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO: 21 und SEQ ID NO: 22, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Swal, Xhol, AatI, Apal, Asp718, Mlul, Ndel, SpeI, EcoRV, Sall, Clal, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames erhitzen auf 95°C und langsames abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

40

SEQ ID NO: 21:

5'-TCGAATTAAATCTGAGAGGCCCTGACGTCGGCCCGGTACCACGCGTCATAT
GACTAGTTGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTTCTGCCTTAATTAAAC
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

5

SEQ ID NO22:

5'-GATCATTAAATCCC GG GTCTAGAGGATCCAATTGTTAATTAAACGCAGAAGAG
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAACTAGTCATATGACGCGTGGTACCG
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

10

Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease Xhol und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

25 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

30 Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO: 23 aufgeführt.

35

Beispiel 3

Herstellung des Plasmids PmetA metA

40 Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-

riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 24 und SEQ ID NO 25, der chromosomal DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, ein das metA Gen inklusice des nichkodierenden 5'-Bereichs amplifiziert.

5 SEQ ID NO 24
5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCAGTGCT -3'
und
10 SEQ ID NO 25
5'-CTCTACTAGTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,3 kb Größe wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Asp718 und Spel (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit den Restriktionsenzymen Asp718 und Spel geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

30 Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLik5MCS PmetA ist als SEQ ID NO 26: aufgeführt.

40 Beispiel 9

Herstellung des Plasmid pCLiK5MCS Pgro metA

Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 27 und SEQ ID NO 28, der chromosomal DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden wie Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press ein DNA Fragment von ca. 200 Basenpaaren aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich (Region der Expressionseinheit) der Gens GroES (Pgro) amplifiziert.

SEQ ID NO: 27
5'-GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTGGCTGCC -3'
und
15 SEQ ID NO :28
5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGATGAATCCCTCCATGAG -3'

Das erhaltene DNA Fragment wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.
20 Ausgehend vom Plasmid PmetA metA als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO: 30 ein Teil von metA amplifiziert.

25 SEQ ID NO 29
5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'
und
SEQ ID NO 30
5'-CTGGGTACATTGCGGCC -3'

30 Das erhaltene DNA Fragment von ungefähr 470 Basenpaaren wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt.

35 In einer weiteren PCR Reaktion wurden die beiden oben erhaltenen Fragmente gemeinsam als Template eingesetzt. Durch die mit dem Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 28 eingebrachten, zu metA homologen Sequenzen, kommt es im Zuge der PCR-Reaktion zu einer Anlagerung beider Fragmente aneinander und einer Verlängerung zu einem durchgehenden DNA-Strang durch die eingesetzte Polymerase. Die Standardmethode wurde dahingehend modifiziert, dass die verwendeten Oligonukleotidpri-

mer SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 30 erst mit Beginn des 2. Zykluses dem Reaktionsansatz zugegeben wurden.

Das amplifizierte DNA Fragment von ungefähr 675 Basenpaaren wurde mit dem

- 5 GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Xhol und Ncol (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das ca. 620 Basenpaar große DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt.
- 10 Das Plasmid PmetA metA SEQ ID NO: 26 wurde mit den Restriktionsenzymen Ncol und Spel (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auf trennung wurde ein ca. 0,7 kb großes metA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aus der Agarose aufgereinigt.
- 15 Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit den Restriktionsenzymen Xhol und Spel (Roche Diagnostics, Mannheim) geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auf trennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.
- 20 Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment und dem metA-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- 25

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977)

- 30 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PGroESmetA ist als SEQ ID NO: 31 aufge-

- 35 führt.

Beispiel 10

MetA-Aktivitäten

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS PmetA und pCLiK5MCS PGroESmetA nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

5 C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium ((40 g/l Saccharose, 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l K_2HPO_4 , 10 0,25g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 54 g Aces, 1 ml CaCl_2 (10 g/l), 1 ml Protocatechoat (300 mg/10 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l CuSO_4 , 0,02 g/l $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ Vitamin B_{12} , 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin (100 mg/l), pH7,0) bei 30°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit 15 kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD_{600} von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhren der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

20 20 Die enzymatische Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM MgCl_2 , 100 μM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 μM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zellextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysat gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufgenommen.

25 30 Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a gezeigt.

Tabelle 1a

Stamm	spezifische Aktivität [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS PGroESmetA	109,0

Die Aktivität von MetA konnte durch die Verwendung der heterologen Expressionseinheit erheblich gesteigert werden.

Beispiel 11

5 Herstellung des Plasmids pClik5MCS metA ohne Startcodon

Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 32 bis SEQ ID NO 33, der chromosomal DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, die terminationsregion des groEL Gens amplifiziert.

15 SEQ ID NO 32
5'- GGATCTAGAGTTCTGTGAAAAACACCGTG-3'

SEQ ID NO 33
5'- GCGACTAGTGCCCCACAAATAAAAACAC-3'

20

Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 60 bp Größe wurden mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen 25 XbaI und BcNI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit dem Restriktionsenzymen XbaI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit 30 GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem 60 bp großen Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) halbigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

5 Das entstandenen Plasmid pCLiK5MCS PgroES term SEQ ID NO: 34 aufgeführt.

Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995)
10 Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpara-
riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 35 und SEQ ID NO 36, der chromoso-
malen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al.
(1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press
15 beschrieben, das metA Gen ohne Sartcodon amplifiziert.

SEQ ID NO 35
5'-GAGACATATGCCAACCTCGCGCCTTCAGG -3'
und
20 SEQ ID NO 36
5'-CTCTACTAGTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,2 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA
and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des
25 Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen NdeI
und BclI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit
GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pClik5MCS groEL term SEQ ID NO: 34 wurde mit den Restriktionsenzymen
30 NdeI und BclI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer
Auf trennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid
DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert
35 und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular
Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente
E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid
tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB
Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS metA ohne Startcodon ist als SEQ ID NO: 37 aufgeführt.

10

Beispiel 12

Konstruktion von Expressionseinheiten Pgro mit unterschiedlichen spezifischen Expressionsaktivitäten durch unterschiedliche RBS-Sequenzen und Abstände zum Startcodon von metA

15

Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 38 bis SEQ ID NO 43, der chromosomal DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, die verschiedenen Expressionseinheiten amplifiziert. Dabei diente der Oligonukleotidprimer 1701 (SEQ ID NO 38) als sense Primer und wurde mit den anderen Oligonukleotidprimern kombiniert.

25

SEQ ID NO 38

Oligonukleotidprimer 1701

5'- GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTGGCTGCC-3'

30 SEQ ID NO 39

Oligonukleotidprimer 1828

5'- ctctcatatgcAATCCCTCCATGAGAAAAATT-3'

SEQ ID NO 40

35 Oligonukleotidprimer 1831

5'- ctctcatatgcgcggccgcAATCCCTCCATGAGAAAAATT-3'

SEQ ID NO 41

Oligonukleotidprimer 1832

40 5'- ctctcatatgcAAtctctccATGAGAAAAATTGTGTG-3'

SEQ ID NO 42

Oligonukleotidprimer 1833

5' ctctcatatgcAAtcctcATGAGAAAAATTGTGTG-3'

5

SEQ ID NO 43

Oligonukleotidprimer 1834

5' ctctcatatgcAAtcctcATGAGAAAAATTGTGTG-3'

10 Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 200 bp Größe wurden mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

15 Der Vektor pBS KS+ (SEQ ID NO: 44) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten und ein 2,9 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

20 Das Vektorfragment wurde zusammen mit den PCR-Fragmenten mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20 μ g/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

25

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzeraktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandenen Plasmide wurden mit pKS Pgro 1701/1828, pKS Pgro 1701/1831, pKS Pgro 1701/1832, pKS Pgro 1701/1833 und pKS Pgro 1701/1834 bezeichnet.

35 Diese Plasmide wurden anschließend mit den Rektriktionenzymen NdeI und Xhol geschnitten. Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 200 bp Größe wurden isoliert und mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Der Vektor pCLiK5MCS metA ohne Sartcodon SEQ ID NO: 37 wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und XbaI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auf trennung mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

5

Das Vektorfragment wurde zusammen mit den 200 bp großen Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20 μ g/ml) halogen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. 15 Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

20 Das entstandenen Plasmide pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA , pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA und pCLiK5MCS Pgro 1701/1834 metA sind als SEQ ID NO: 45 bis 49 aufgeführt.

25 Der Expressionseinheit Pgro wurde durch die Wahl der Oligonukleotide wie in Figur 2 beschrieben verändert.

Der Stamm Corynebacterium glutamicum ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS Pgro metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA, , 30 pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA , pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA und pCLiK5MCS Pgro 1701/1834 nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene 35 Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium (40 g/l Saccharose, 20 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l K₂HPO₄, 0,25g/l MgSO₄ x 7H₂O, 54 g Aces, 1 ml CaCl₂ (10 g/l), 1 ml Protocatechuat (300 mg/10 40 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l FeSO₄ x /H₂O, 10 g/l MnSO₄ x H₂O, 2 g/l

ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l CuSO₄, 0,02 g/l NiCl₂ x 6 H₂O), 100 µg/l Vitamin B₁₂, 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin (100 mg/l), pH7,0) bei 30°C für 5 h angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die

5 Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Riboly-
serröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge geklärt
10 und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsan-
sätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM MgCl₂, 100
15 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zellex-
trakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysat gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufge-
nommen.

20 Die Ergebnisse sind in Tabelle 2a gezeigt.

Tabelle 2a

Stamm	spezifische Aktivität [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	7,5
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro metA	109,0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA	30,6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metaA	8,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metaA	60,6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA	217,3
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1835 metaA	96,3

Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
 - 5 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
 - B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
 - 10 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
 - D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)
- zur Transkription von Genen.
- 15 2. Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.
- 20 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit enthält:
 - E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
 - F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
 - G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
 - H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).
- 25 4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit aus einer Nukleinsäure der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 besteht.
- 30 5. Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
 - A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
 - B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %
- 35

auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

5 D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

10 6. Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 5 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

15 7. Expressionseinheit nach Anspruch 6, enthaltend

E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder

F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder

20 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

8. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

30 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder

35 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

5 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

20 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

25 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

30 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit

40

Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

5 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

20 12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

25 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

30 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

35 13. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
5
 - d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
 - 15 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
 - 20 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
 - 25 d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
 - 35 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der
- 40

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 30 17. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

35 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Deydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrognease, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystahionin-gamma-Synthase, Cystahionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-

Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfat-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

10

20. Expressionskassette, umfassend

- a) mindestens eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und
- b) mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

20

25

30

35

21. Expressionskassette nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen

22. Expressionskassette nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serin-hydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

23. Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22.

30 24. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

35 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

5 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

10 25. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 26. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass

35 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

40

5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

10 27. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 28. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

40

5 br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

10 29. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

15 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

20 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

25 30. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

30 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifi-scher Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

31. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit erhö-hter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass man

10

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp er-höht oder

15

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinhei-ten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressi-onseinheiten heterolog sind.

20

32. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 31, dadurch gekenn-zeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressi-onseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressions-aktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

30

dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, ge-gabenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder meh-rerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressi-onseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikrorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, er-folgt oder

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

10

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem edogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

15

dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

25

35. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 34, enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

30

36. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 24 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein

35

40

aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

37. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

38. Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24 bis 37.

39. Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-

Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase,
Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren
kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren
kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Py-
ruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase,
Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nuklein-
säuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren
kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend
eine Malat-Quinon-Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-
Phosphat-Deydrogease, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-
Dehydrognease, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren
kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter,
Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Ar-
ginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-
Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase,
Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-
Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-
Phosphofructokinase,

20 40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch
veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhö-
te Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Dia-
minopimelat- Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-
Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydridipicolinate-
Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-
Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Trio-
sephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators
LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des
Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität,
Glucose-6-Phosphat-Deydrogease-Aktivität, 6-Phosphogluconat-
Dehydrognease-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Ly-
sin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyru-
vat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein Op-
cA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität
und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.

30 41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die gene-
tisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine
reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der

35 40

Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität,
5 Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

42. Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-TransferaseNukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase II , Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend einen RXA0655 Regulator und
20 Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.
25
30
35
40

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Ho-

moserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serin Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität I-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität, Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen.

44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

45. Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend

einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, , Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein OpcA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase

46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

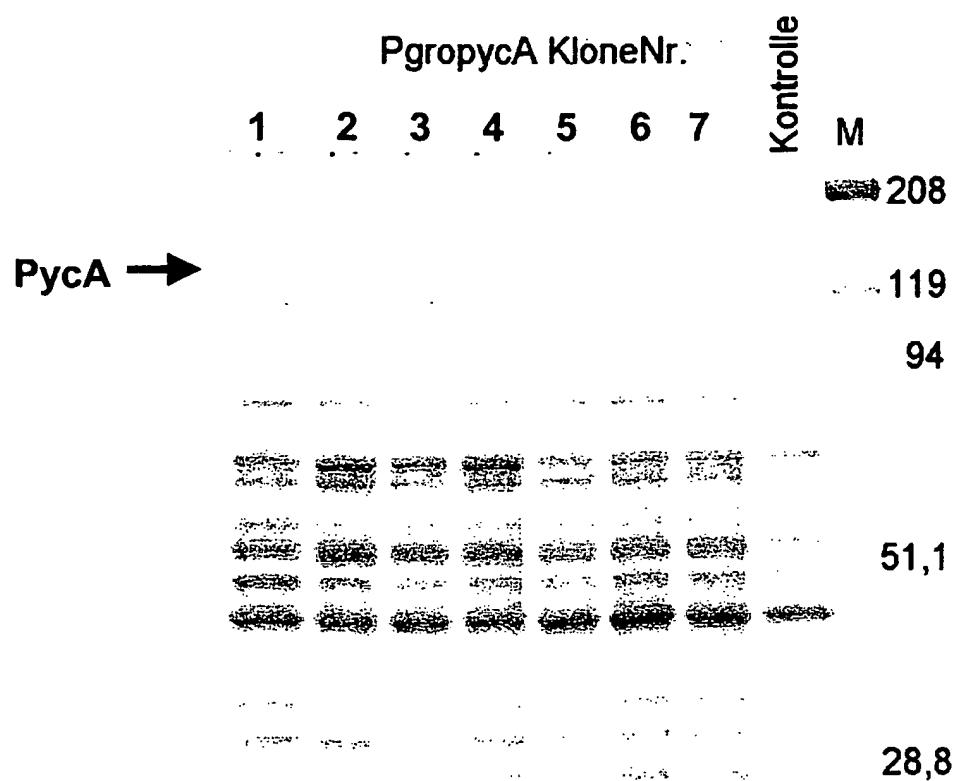
47. Verfahren nach Anspruch 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetylactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

48. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Produkte nach und/oder während des Kultivierungs-

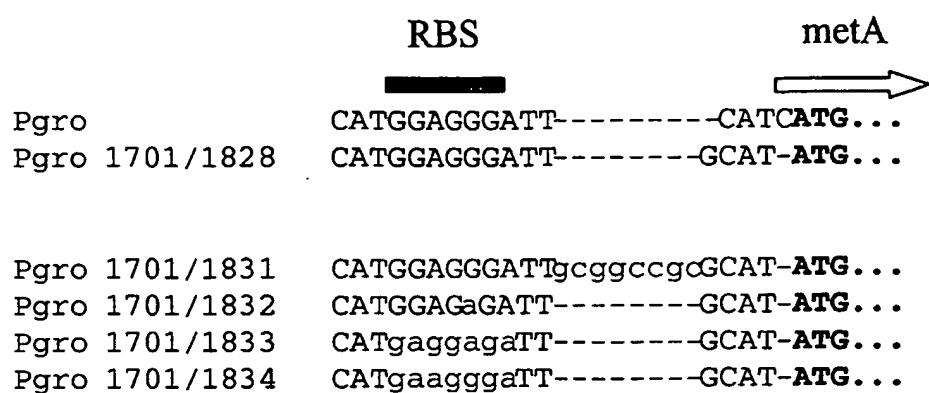
schrittes aus dem Kultivierungsmedium isoliert und gegebenenfalls aufgereinigt werden.

49. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
5
50. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
10
51. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53.
15
52. Expressionseinheit gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. als ribosomale Bindungsstelle verwendet wird.
53. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52.
20
54. Expressionseinheit gemäß Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region verwendet wird.
25

Figur 1



Figur 2



SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft
5 <120> Pgro-Expressionseinheiten
<130> PF 55184/Mec
10 <160> 53
<210> 1
<211> 164
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
15 <220>
<223> SEQ_ID_1_GROES_RXA00497_PROMOTOR
20 <400> 1
cggtttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60
tctcgggggt agagtgc当地 atagggttgg tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120
ctgtgctgga aacccacaac cggcacacac aaaattttc tc当地 164
25 <210> 2
<211> 177
<212> DNA
30 <213> Corynebacterium glutamicum
<220>
<223> SEQ_ID_2_GROES_RXA00497_GESAMTE_EXPRESSIONSEINHEIT
35 <400> 2
cggtttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60
tctcgggggt agagtgc当地 atagggttgg tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120
40 ctgtgctgga aacccacaac cggcacacac aaaattttc tc当地 ggaggg attcatc 177

<210> 3
<211> 1365
45 <212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
<220>
<223> SEQ_ID_3_RXA00077
50 <400> 3
atgaatgatg agaatattca aagctccaac tatcagccat tccc gagttt tgacgattgg 60
aaacagatcg aggtgtcgct ctttagatgtc atcgaatcct cacgccattt ttctgatttg 120
55 aaagatagca ctgatcggtc tgcgttagat gctgcgttag agagagcaaa aagagctgcc 180
gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcgttt tacccataaca 240
60 gttgcaacgc aggttagggc ttgggagcaa caaatggcgta gaaaggcaa acatgttaag 300
cctgcgtttt acgataactct agaaggctt gatgttgc tcgtgcgt aactggtaga 360
actccaatct ctcagcaatg gattagaaat ttgcacgccc tcattctgcg gagccaagaa 420
65 agccacgagg ttttacagc cggtggagtc caaaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtt 480
aaaactcagg caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540

gaagatactc ctgctgaaat ggcttagattt attcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600
 5 gcagccgaga aggttattca agctgcctat gcccaactatg ctttcgtatg tattcatcct 660
 tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgttttct atacaaagat 720
 cctgggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780
 10 gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840
 actattaact ctattatcg tcatctact accccgatcg cgggtaaatc tggttcggct 900
 15 aagctttcgg atgcgctacg ccccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960
 aggctccaag aaagtttatt tacagaaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020
 aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt ccccattcaa tctgccagag 1080
 20 ggctataacg cttccctga tagctattgt ctgacccctag cttcaatag caactctcca 1140
 aaacaaatct tccaccgcgt atccatagta atagcagctc gagatggaa aagagcgc 1200
 25 agcgacccctcg tggcagctac ttctattgga tacaacttac acgcttacgg acgtgaagtc 1260
 gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgcccga cgggattgt 1320
 gatcacttct taacccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365
 30
 <210> 4
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 35
 <400> 4
 Met Asn Asp Glu Asn Ile Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Pro Phe Pro Ser
 1 5 10 15
 40 Phe Asp Asp Trp Lys Gln Ile Glu Val Ser Leu Leu Asp Val Ile Glu
 20 25 30
 Ser Ser Arg His Phe Ser Asp Leu Lys Asp Ser Thr Asp Arg Ser Ala
 45 35 40 45
 Leu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Ala Lys Arg Ala Ala Val Asp Thr
 50 55 60
 50 Asn Ala Ile Glu Gly Ile Phe Gln Thr Asp Arg Gly Phe Thr His Thr
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Gln Val Gly Ala Trp Glu Gln Gln Met Ala Met Lys Gly
 85 90 95
 55 Lys His Val Lys Pro Ala Phe Asp Asp Thr Leu Glu Gly Phe Glu Tyr
 100 105 110
 60 Val Leu Asp Ala Val Thr Gly Arg Thr Pro Ile Ser Gln Gln Trp Ile
 115 120 125
 Arg Asn Leu His Ala Val Ile Leu Arg Ser Gln Glu Ser His Glu Val
 130 135 140
 65 Phe Thr Ala Val Gly Val Gln Asn Gln Ala Leu Gln Lys Gly Glu Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Pro Asn Ser Pro Gln Arg Ser Asp Gly Ser Val His Ala

3

	165	170	175
	Tyr Ala Pro Val Glu Asp Thr Pro Ala Glu Met Ala Arg Phe Ile Ser		
	180	185	190
5	Glu Leu Glu Ser Lys Glu Phe Leu Ala Ala Glu Lys Val Ile Gln Ala		
	195	200	205
	Ala Tyr Ala His Tyr Ala Phe Val Cys Ile His Pro Phe Ala Asp Gly		
10	210	215	220
	Asn Gly Arg Val Ala Arg Ala Leu Ala Ser Val Phe Leu Tyr Lys Asp		
	225	230	235
	Pro Gly Val Pro Leu Val Ile Tyr Gln Asp Gln Arg Arg Asp Tyr Ile		
15	245	250	255
	His Ala Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Pro Leu Leu Leu Ile Arg		
	260	265	270
20	Phe Phe Ala Glu Arg Val Thr Asp Thr Ile Asn Ser Ile Ile Val Asp		
	275	280	285
	Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp		
25	290	295	300
	Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His		
	305	310	315
	Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu		
30	325	330	335
	Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile		
	340	345	350
35	Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser		
	355	360	365
	Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe		
40	370	375	380
	His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser		
	385	390	395
	410	415	
45	Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr		
	405	410	
	Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val		
	420	425	430
50	Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala		
	435	440	445
	Lys Lys Phe Gln Gln Asn		
55	450		

<210> 5
 <211> 19
 60 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

 <220>
 <223> SEQ_ID_5_GRO3
 65 <400> 5
 gccgcagcaa acccagtag

5 <210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

10 <220>
 <223> SEQ_ID_6_GRO11

15 <210> 7
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

20 <220>
 <223> SEQ_ID_7_PYC6

 <400> 7
 tttttctcat ggagggattc atcgtgtcga ctcacacatc ttcaacgctt ccag 54

25 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
30 <220>
 <223> SEQ_ID_8_PYC3

 <400> 8
 cccgccagcaa cgcacgcaag aaa 23

40 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

45 <220>
 <223> SEQ_ID_9_GRO12

 <400> 9
 gcattcgcgc cgctcgtaac ta 22

50 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

55 <220>
 <223> SEQ_ID_10_PYC11

 <400> 10
 ggttccccgcg ccctggtaa 19
60

 <210> 11
 <211> 5720
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

65 <220>
 <223> SEQ_ID_11_PK19_MOB_SACB

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (562 )..(1356 )
5 <223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (1385 )..(1847 )
10 <223> PsacB

<220>
<221> misc_feature
<222> (1848 )..(3266 )
15 <223> SacB

<400> 11
ggtcgactct agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc actggccgtc gtttacaac 60
20 gtcgtactg gaaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg cttgcagca catccccctt 120
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 180
25 gcctgaatgg cgaatggcga taagcttagt tcacgctgcc gcaaggactc agggcgcaag 240
ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtcgcg agaaacggtg ctgaccccg 300
atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgaaa gagaaagcag 360
30 gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag cttagactgg cggttttatg gacagcaagc 420
gaacctggaaat tgccagctgg ggcccccctt ggtaaggttgg aagcccttgc caaagtaaac 480
35 tggatggctt tcttgcgc aaggatctga tggcgccagg gatcaagatc tgatcaagag 540
acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc 600
gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcg ctgctctgat 660
40 gcccgggtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc ttttgtcaa gaccgacctg 720
tccgggtcccc tgaatgaact ccaagacgag gcagcgcggc tatcggtggc ggcacgcacg 780
45 ggcgttcctt ggcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 840
ttggggcgaag tgccggggca ggtatccctg tcatctcacc ttgtctctgc cgagaaagta 900
tccatcatgg ctgatgcaat gcccggctg catacgcttgc atccggctac ctgcccattc 960
50 gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggtatggaaac cggtttgtc 1020
gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgccgc cagccgaact gttcgccagg 1080
55 ctcaaggcgc ggtatccccga cggcgaggat ctcgtctgtca cccatggcga tgcctgtttg 1140
ccgaatatca tggtgaaaaa tggccgttt tctggattca tgcactgtgg cccgctgggt 1200
gtggcggacc gctatcagga catagcggttgc gctacccgttgc atattgctga agagcttggc 1260
60 ggcgaatggg ctgaccgtt cctctgtctt tacggatacg ccgtccccga ttgcagcgc 1320
atcgcccttctt atcgcccttctt tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttgcgttagag 1380
gatcgatccct tttaaccca tcacatatac ctgcgttca ctattatataa gtgaaatgag 1440
65 atattatgat attttctgaa ttgtgattaa aaaggcaact ttatgcccattt gcaacagaaaa 1500
ctataaaaaa tacagagaat gaaaagaaac agatagattt tttagttctt taggccccgtt 1560
```

gtctgcaa at cctttatga ttttctatca aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat 1620
5 ccaaacgaga gtctaata gta atgaggcga aaagtaaatc gcgcgggtt gttactgata 1680
aagcaggcaa gacctaaaat gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt caccccttac 1740
atatttttagg tctttttta ttgtgcgtaa ctaacttgcc atctcaa ac aggaggcgt 1800
10 gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa 1860
agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgca 1920
15 ctcaagcgtt tgcaaaagaa acgaaccaaa agccatataa ggaacatac ggcatttccc 1980
atattacacg ccatgatatg ctgcaa atcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag 2040
tttctgaatt tgattcgtcc acaattaaaa atatcttcc tgcaaaaggc ctggacgtt 2100
20 gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcactgtcgc aaactatcac ggctaccaca 2160
tcgtcttgc attagccgga gatcctaaaa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct 2220
atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc gtctttaaag 2280
25 acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag 2340
gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgttatt ctacactgat ttctccggta 2400
30 aacattacgg caaaca aaca ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct 2460
ctttgaacat caacgggtta gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt 2520
atcaaaaatgt acagcagttc atcgatgaa gcaactacag ctcaggcgac aaccatacgc 2580
35 tgagagatcc tcactacgta gaagataaag gccacaaaata ctttgttattt gaagcaaaca 2640
ctggaaactga agatggctac caaggcgaag aatcttattt taacaaagca tactatggca 2700
40 aaagcacatc attctccgt caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaacgca 2760
cggtgagtt agcaaacggc gctctcggtta tgattgagct aaacgatgat tacacactga 2820
45 aaaaagtgtat gaaaccgctg attgcatacata acacagtaac agatgaaattt gaacgcgcga 2880
acgtctttaa aatgaacggc aaatggtacc tggtcactga ctcccgccga tcaaaaatgaa 2940
cgattgacgg cattacgtct aacgatattt acatgctgg ttatgttctt aattctttaa 3000
50 ctggccata caagccgctg aacaaaactg gccttgggtt aaaaatggat cttgatccta 3060
acgatgtaac cttaacttac tcacacttcg ctgtacatca agcgaaagga aacaatgtcg 3120
55 tgattacaag ctatatgaca aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc 3180
cgagcttcct gctgaacatc aaaggcaga aacatctgt tgtcaaagac agcatccttgc 3240
aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa aacgcaaaag aaaaatgccga tgggtaccga 3300
60 gcgaaatgac cgaccaagcg acgccccacc tgccatcagc agatttcgat tccaccgccc 3360
ccttctatga aaggtgggc ttggaaatcg ttttccggga cgcctcgcc gacgtgctca 3420
tagtccacga cgcccggtat ttgttagccc tggccgacgg ccagcaggta ggccgacagg 3480
65 ctcatgccgg ccgcgcgcgc cttttcctca atcgcttcc gttcgtctgg aaggcagtac 3540
accttgatag gtgggtgccc cttctgggtt ggcttgggtt catcagccat ccgcttgcgg 3600

tcatctgtta cgccggcggt agccggccag cctcgcagag caggattccc gttgagcacc 3660
5 gccaggtgcg aataagggac agtgaagaag gaacacccgc tcgcgggtgg gcctacttca 3720
cctatcctgc ccggctgacg ccgttggata caccaaggaa agtctacacg aacccttgg 3780
caaaaatcctg tatatcgtgc gaaaaaggat ggatataccg aaaaaatcgc tataatgacc 3840
10 ccgaagcagg gttatgcacg ggaaaagcgc tgcttccctg ctgtttgtg gaatatctac 3900
cgactggaaa caggcaaattt ctagaaactt ctgaaactgag gggacaggcg agagacgtg 3960
15 ccaaagagct cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatacg cccggtagtg atcttatttc 4020
attatggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt 4080
ggcccagggc ttcccggtat caacaggac accaggattt atttattctg cgaagtgtac 4140
20 ttccgtcaca ggtattttt cggcgcaaag tgcgtcggtt gatgtgccat acttactgtat 4200
ttagtgtatg atggtgtttt tgaggtgctc cagtggttcc tgtttctatc agtcctgaa 4260
25 aatctcgata actcaaaaaa tacgccccgt agtgatctt tttcattatg gtgaaagttg 4320
gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat tttcgccaaa agttggccca gggcttcccg 4380
gtatcaacag ggacaccagg atttatttt tctgcaagt gatctccgt cacaggtatt 4440
30 tattcggcgc aaagtgcgtc ggggtatgtc gccaacttac tgatttagtg tatgtatgg 4500
tttttgggtt gctccagtgg cttctgtttc tattcagggtt ggtatgttcc ccagcgcggg 4560
35 gatctcatgc tggagttttt cggccacccc aaaaggatct aggtgaagat cttttttgtat 4620
aatctcatga ccaaaaatccc ttaacgttag ttttctgtcc actgagcgtc agaccccgta 4680
gaaaagatca aaggatcttcc ttgagatctt ttttttctgtc gcgtaatctg ctgcttgcaa 4740
40 aaaaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt ttttgcggg atcaagagct accaactt 4800
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 4860
45 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtgcaccgc ctacataacct cgctctgtca 4920
atcctgttac cagtggctgc tgccagtgcc gataagtctgt gtcttaccgg gttggactca 4980
agacgatagt taccggataa ggccgcagcg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag 5040
50 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 5100
agcgccacgc ttcccgaaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 5160
55 acaggagagc gcacgaggaa gcttccagg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 5220
gggtttcgcc acctctgtact tgagcgtcga tttttgtat gctcgtagg ggggcggagc 5280
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggctttt ttacggttcc tggccctttt ctggccctttt 5340
60 gctcacatgt tctttccgtc gttatccccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5400
gagttagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtac agtgagcgg 5460
65 gaagcggaaag agcgcccaat acgcaaacgg cctctcccg cgcgtggcc gattcattaa 5520
tgcaatggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggcgtc gtgagcgtca cgcaattaat 5580
gtgagttacgc tcactcatta ggcaccccgactttttttt gcttacact ttatgtttcc ggctcgatg 5640

ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 5700
5 gccaagcttg catgcctgca 5720

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
10 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> SEQ_ID_12_PYC14

15 <400> 12
ccggcgaagt gtctgctcgc gtga 24

<210> 13
20 <211> 18
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
25 <223> SEQ_ID_13_PYC15

<400> 13
accggcccc agtttttc 18

30 <210> 14
<211> 7438
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

35 <220>
<223> SEQ_ID_14_PK19_MOB

<220>
40 <221> misc_feature
<222> (1)..(1422)
<223> SacB complement

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (1423)..(1885)
<223> PsacB complement

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (1914)..(2708)
<223> KanR

<220>
55 <221> misc_feature
<222> (3118)..(3622)
<223> 5' pycA

<220>
60 <221> misc_feature
<222> (3863)..(4039)
<223> Pgro

<220>
65 <221> misc_feature
<222> (4040)..(4888)
<223> Teil pycA

<400> 14
ttatttgtta actgttaatt gtccttgicc aaggatgctg tctttgacaa cagatgtttt 60
5 cttgcctttg atgttcagca ggaagctcg cgcaaacgtt gattgttgc ctgcgttagaa 120
tcctctgtt gtcatatagc ttgtaatcac gacattgtt ccttcgctt gaggtacaggc 180
gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcggtt aggtcaaga tccatttttta acacaaggcc 240
10 agttttgttc agcggcttgc atgggccagt taaaagaatta gaaacataac caagcatgttta 300
aatatcgtaa gacgtaatgc cgtaatcgat cattttgtat ccgcgggagt cagtgaacag 360
15 gtaccatttg ccgttcattt taaagacggtt cgccgcgttca atttcatctg ttactgtgtt 420
agatgcaatc agcggtttca tcactttttt cagtgtgtaa tcatcgtaa gctcaatcat 480
accgagagcg ccgtttgcta actcagccgt gcgtttttta tcgcttgca gaagttttt 540
20 actttcttga cggagaatgtt atgtgtttt gcccatagtat gctttgttaa ataaagattt 600
ttcgccttgg tagccatctt cagttccagt gtttgcgttca aatactaagt atttgtggcc 660
25 tttatcttctt acgttagtgag gatctctcag cgtatgggttgc tgccctgagc tgttagttgc 720
ttcatcgatg aactgctgtt cattttgtata cgttttcccg tcaccgtcaa agattgattt 780
ataatcctt acaccgttga tggtaaaaga gctgtctgtt gctgatacgtaaacttgc 840
30 agttgtcagt gtttgcgttgc cgtaatgttt accggagaaaa tcagtgtaga ataaacggat 900
tttccgtca gatgttaatgttggcttgcacc tgaccattct tggtttgcgttcttttaggat 960
35 agaatcattt gcatcgaaatt tgtcgtgttgc tttaaagacg cggccagcgt tttccagct 1020
gtcaatagaa gtttcggca cttttgtataa acatgttaa atcgatgtgtt catccgcatt 1080
tttaggatct ccggcttaatgttgc cttttgtataa acatgttaa atcgatgtgtt catccgcatt 1140
40 gtcagcggtt tgtaatggcc agctgtccca aacgtccagg cttttgcag aagagatattt 1200
tttaattgtt gacgaatcaa attcaggaac ttgatattttt tcattttttt gctgttcagg 1260
45 gatttgcagc atatcatggc gtgttatatgtt ggaaatgcgg tatgtttcct tatatggctt 1320
ttggttcggtt ttttcgcaaa acgcttgagt tgcccttccgtt gccagcgttgc cggttagttaaa 1380
ggtaataact gttgtttgtt ttgcaaaactt tttgatgttgc atcgatgttgc tctcctttttt 1440
50 tatgtactgt gttacgggttgc tgcttcttcc agccctcctt gttgaagatg gcaagtttagt 1500
tacgcacaat aaaaaaaagac ctaaaatatgtt taaggggtga cgccaaagta tacactttgc 1560
55 cctttacaca ttttaggtct tgccgtttt atcagtaaca aacccgcgcg atttactttt 1620
cgacccattt ctattagact ctcgtttggta ttgcaactgg tctattttcc tcttttgcgtt 1680
gatagaaaat cataaaaagga ttgcagact acgggcctaa agaactaaaaa aatctatctg 1740
60 ttcttttca ttctctgtat tttttatagt ttctgttgc tgggcataaaa gttgcctttt 1800
taatcacaat tcagaaaata tcataatatc tcatttcact aaataatagt gaacggcagg 1860
tatatgtgtt gggtaaaaaa ggatcgatcc tcttagcgttgc cccagagtcc cgctcagaag 1920
65 aactcgtaa gaaggcgata gaaggcgatg cgctgcgttgc gataccgtaa 1980
agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg ccaagcttcc cagcaatatc acgggttagcc 2040

aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccgc cacagtcat gaatccagaa 2100
5 aagcggccat tttccaccat gatattcgac aagcaggcat cgccatgggt cacgacgaga 2160
tcctcgccgt cgggcattccg cgccattgagc ctggcaaca gttcggttgg cgcgagcccc 2220
tgatgtctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct 2280
10 cgctcgatgc gatgtttcgc ttgggtggcg aatgggcagg tagccggatc aagcgttatgc 2340
agccgccgca ttgcattcagc catgatggat actttctcg caggagcaag gtgagatgac 2400
15 aggagatcct gccccggcac ttcccccata agcagccagt ccctcccgcc ttcagtgaca 2460
acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag cccgcgtgcc 2520
tcgtcttggaa gttcattcag ggcaccggac aggtcggtct tgacaaaaag aaccgggcgc 2580
20 ccctcgctg acagccggaa cacggccgca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag 2640
tcatagccga atagcctctc cacccaaagcg gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgc 2700
25 tcaatcatgc gaaacgatcc tcatttcgtc tttgtatcg atcttgcattcc cctgcgcatt 2760
cagatccttg gcggcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttacca 2820
gagggcgcggc cagctggcaa ttccgggtcg cttgctgtcc ataaaaccgc ccagtcttagc 2880
30 tatcgccatg taagcccact gcaagctacc tgctttctct ttgcgttgc gttttccctt 2940
gtccagatag cccagtagct gacattcatc cggggtcagc accgtttctg cggactggct 3000
35 ttctacgtgt tccgcttcct ttagcagccc ttgcgccttgc agtgcgttgcg gcagcgtgaa 3060
gcttagatgca tgctcgagcg gccgccttgc tgatggatct ctgcagaatt ccccttcgg 3120
gcgaagtgtc tgctcgctg attgtgttc ctttggctac taaccacgc gccaagatgc 3180
40 gttccctgct ccacggttt gtgaagctgt tctggccccc taactctggc ctgatcatcg 3240
gtgggtgtcggt ggtggcaccg accgcgtctg agctgtatcc accgtatcgct gtggcagtga 3300
45 ccaaccgtct gacagttgtc gatctggctg ataccttcgc ggtgtaccca tcattgtcag 3360
gttcgattac tgaaggcagca cgtcagctgg ttcaacatga tgatcttaggc taattttct 3420
gagtcttaga ttttgagaaa acccaggatt gctttgtcgtt ctcctgggtt ttcaactttgt 3480
50 taagcagtt tggggaaaag tgcaaaagttt gcaaaagttt gaaatatttt aagaggtaag 3540
atgtctgcag gtggaaagcgt taaaatgcgt taaaacttggc caaatgtggc aacctttgc 3600
55 aggtgaaaaa ctggggcggg gtaagggcga attccagcac actggccggcc gttacttagct 3660
tatcgccatt cgccatttcag gctgcgcac tttttggaaag ggcgtatcggt gcgggcctct 3720
tcgcttattac gccagctggc gaaagggggta gttgtgttgc ggcgtatcggt ttgggtaaacg 3780
60 ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattcaa cctgtggcgc 3840
aacgctgtat ataacctgcg tacggcttaa agtttggctg ccatgtgaat ttttagcacc 3900
ctcaacagtt gagtgcgtggc actctcgggg gtagagtgcc aaataggttt ttgacacac 3960
65 agttgttacac ccgcgacgac ggctgtgctg gaaaccacaca accggcacac acaaaaatttt 4020
tctcatggag ggattcatcg tgcgtactca cacatcttca acgcttccag cattcaaaaa 4080

gatcttggta gcaaaccgcg gcgaaatcgc ggtccgtct ttccgtgcag cactcgaaac 4140
5 cggtgtcagcc acggtagcta ttatcccccg tgaagatcg ggatcattcc accgctttt 4200
tgcttctgaa gctgtccgca ttggtaccga aggctcacca gtcaaggcgt acctggacat 4260
cgatgaaatt atcggtgcag ctaaaaaagt taaagcagat gccatttacc cgggatacgg 4320
10 ctccctgtct gaaaatgccc agcttgcggc cgagtgtcgc gaaaacggca ttactttat 4380
tggcccaacc ccagaggttc ttgatctcac cggtgataag tctcgccgg taaccgccc 4440
15 gaagaaggct ggtctgccag ttttggcgga atccaccccg agcaaaaaca tcgatgagat 4500
cgtaaaaagc gctgaaggcc agacttaccc catctttgt aaggcagttg cccgtggtgg 4560
cgjacgcggt atgcgttttgc ttgcttcacc tgatgagctt cgcaaattag caacagaagc 4620
20 atctcgtgaa gctgaagcgg cttdcgccga tggcgcggta tatgtcgaac gtgtgtgtat 4680
taacccttag catattgaag tgcagatcct tggcgatcac actggagaag ttgtacacct 4740
25 ttatgaacgt gactgctcac tgcaagcgtcg tcaccaaaaa gttgtcgaaa ttgcgccagc 4800
acagcatttgc gatccagaac tgcgtgatcg catttgcgcg gatgcagtaa agttctgccc 4860
ctccatttgtt taccagggcg cgggaaccaa gggcgaattc ctctggataa tcatcgccgt 4920
30 agttacgagc ggccgcaatg caagggcgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcccttaga 4980
gtcgacactgc aggcatgcaa gcttggcgta atcatggtca tagcttttc ctgtgtgaaa 5040
35 ttgttatccg ctcacaattt cacacaacat acgagccgga agcataaaagt gtaaagcctg 5100
gggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttgc cgctcaactgc cccgtttcca 5160
gtcggggaaac ctgtcgccg agctgcatta atgaatcgcc caacgcgcgg ggagaggcgg 5220
40 tttgcgtatt gggcgcttt ccgcttcctc gctcaactgac tcgctgcgtc cggtcgttgc 5280
gctgcggcga gcggtatcg ctcaactcaaa ggccgtataa cggttatcca cagaatcagg 5340
45 ggataacgcgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 5400
ggccgcgttg ctggcggttt tccataggct cccgccttgc gacgagcatc acaaaaatcg 5460
acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 5520
50 tggaaagctcc ctgcgtgcgt ctccctgttcc gaccctgcgg cttaccggat acctgtccgc 5580
ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgttaggt atctcagttc 5640
55 ggtgttaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg 5700
ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaaccg gtaagacacg acttatacgcc 5760
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 5820
60 gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttgc gttatcgcc 5880
tctgcgtgaag ccagttaccc tccggaaaaag agttggtagc tcttgcgttcc gcaaacaac 5940
65 caccgcgttgtt agcgggtggtt tttttgttttgc caagcagcag attacgcgcga gaaaaaaaaagg 6000
atctcaagaa gatcccttga tctttctac ggggtctgac gtcagtgaa acgaaaactc 6060
acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcctttggg 6120

gtgggcgaag aactccagca tgagatcccc gcgctggagg atcatccagc cctgataaaaaaa 6180
5 acagaagcca ctggagcacc tcaaaaacac catcatacac taaatcagta agttggcagc 6240
atcacccgac gcactttgcg cgaataaat acctgtgacg gaagatcaact tcgcagaata 6300
aataaaatcct ggtgtccctg ttgataccgg gaagccctgg gccaaactttt ggcgaaaatg 6360
10 agacgttgat cggcacgtaa gaggttccaa ctttcaccat aatgaaataa gatcaactacc 6420
gggcgtattt tttagttat cgagatttc aggagctgat agaaacagaa gccactggag 6480
15 cacctcaaaa acaccatcat acactaaatc agtaagttgg cagcatcacc cgacgcactt 6540
tgcgccgaat aaataccctgt gacggaagat cacttcgcag aataaataaa tcctggtgtc 6600
cctgttgcata ccgggaagcc ctgggccaac ttttggcgaa aatgagacgt tgatcggcac 6660
20 gtaagaggtt ccaacttca ccataatgaa ataagatcac taccggcgat attttttgag 6720
ttatcgagat ttccaggagc tctttggcat cgtctctcgc ctgtcccctc agttcagtaa 6780
25 tttcctgcata ttgcctgttt ccagtcggta gatattccac aaaacagcag ggaagcagcg 6840
ctttccgct gcataaccct gcttcggggt cattatagcg atttttcgg tatatccatc 6900
cttttcgcata cgatatacag gattttgcga aagggttcgt gtagacttgc cttgggtgtat 6960
30 ccaacggcgat cagccgggca ggataggtga agtaggcccac cccgcgagcg ggtgttcctt 7020
cttcactgtc ctttattcgc acctggcggt gctcaacggg aatcctgctc tgcgaggctg 7080
35 gccggctacc gccggcgtaa cagatgaggg caagcggatg gctgatgaaa ccaagccaaac 7140
caggaaggcgcg agcccaccta tcaaggtgta ctgccttcca gacgaacgaa gagcgttattga 7200
ggaaaaggcg gccccggcccg gcatgagccct gtcggcctac ctgctggcccg tcggccaggg 7260
40 ctacaaaaatc acgggcgtcg tggactatga gcacgtccgc gaggcggtcc cggaaaaacga 7320
ttccgaagec caacccatcata tagaaggcg cggtggaaatc gaaatctcgat gatggcagg 7380
45 tggcgctcgat ttggcggtc atttcgctcg gtacccatcg gcattttctt ttgcgttt 7438

<210> 15
<211> 52
<212> DNA
50 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_15

55 <400> 15
cccgggatcc gctagccgcg cccggccgg cccgggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 16
60 <211> 53
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
65 <223> SEQ_ID_16

<400> 16
tcttagactcg agcggccgcg gccggccctt aaattgaaga cgaaaggccc tcg 53

5 <210> 17
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

10 <220>
 <223> SEQ_ID_17
 <400> 17
 gagatctaga cccggggatc cgctagcggt ctgctaaagg aagcgga 47

15 <210> 18
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

20 <220>
 <223> SEQ_ID_18
 <400> 18
 gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

25 <210> 19
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

30 <220>
 <223> SEQ_ID_19
 <400> 19
 gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaa 34

35 <210> 20
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

40 <220>
 <223> SEQ_ID_20
 <400> 20
 gagagggcgg ccgctcaagt cggtcaagcc acgc 34

45 <210> 21
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

50 <220>
 <223> SEQ_ID_21
 <400> 21
 tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggccccgtta ccacgcgtca tatgactagt 60

55 tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcgt ttaattaaca attgggatcc 120

60 tctagaccgg ggatttaaat 140

65 <210> 22
 <211> 140

<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

5 <220>
<223> SEQ_ID_22

<400> 22
gatcatttaa atccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60

10 tgtcgacgat atcccttaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gccccgacgtc 120
aggcctctcg agatttaaat 140

15 <210> 23
<211> 5091
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
<223> SEQ_ID_23_PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (469)..(1260)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (1527)..(2387)
<223> Ori EC(pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (2533)..(3207)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (3541)..(4662)
<223> Rep Protein

<400> 23
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagtt 60

45 cgAACCTAGG gatATCGTCG acATCGATGc ttttctgcgt taattAACAA ttgggatCCT 120
ctAGACCCGG gATTTAAATC gCTAGCGGGC tgctAAAGGA AGCGGAACAC gtagAAAGCC 180

50 agtCCGCAGA AACGGTGCTG ACCCCGGATG AATGTCAGCT ACTGGGCTAT ctggacaagg 240
gAAAACGCAA GCGCAAAGAG AAAGCAGGTA GCTTGCAGTG GGCTTACATG GCGATAgCTA 300

55 gACTGGGCGG ttttatggac AGCAAGCGAA CCGGAATTGC CAGCTGGGC GCCCTCTGGT 360
aAGGTGGGA AGCCCTGCAA AGTAAACTGG ATGGCTTCT TGCCGCCAAG GATCTGATGG 420
CGCAGGGGAT CAAGATCTGA TCAAGAGACA GGATGAGGAT CGTTCGCAT GATTGAACAA 480

60 gATGGATTGc ACgcAGGTTc TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTcGG CTATGACTGG 540
GCACAAACAGA CAATCGGCTG CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGCc 600
CCGGTTCTT TTGTCAAGAC CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGGCA 660
65 GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC CACGACGGGC GTTCCCTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC 720
ACTGAAGCGG GAAGGGACTG GCTGCTATTG GGCAGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCCTGTCA 780

tctcacccggc gaaaatgtcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcac 840
5 acgcttgcac cggttacccg cccatcgac caccaagcga aacatgcac cgagcgagca 900
cgtactcgaa tggaaaggccgg tcttgcgtat caggatgtc tggacgaaga gcatcagggg 960
10 ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgccca tgccccacgg cgaggatctc 1020
gtcggtacccc atggcgatgc ctgtttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg ccgttttct 1080
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcggtggct 1140
15 acccgtgata ttgctgaaga gcttggcgcc gaatgggtcg accgcttct cgtgtttac 1200
ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttgc cgagttcttc 1260
tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccc accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320
20 atttcgattc cacccggcc ttctatgaaa gggtgggtt cggaaatcggtt ttccgggacg 1380
ccggctggat gatcctccag cgccgggatc tcatgtcgta gttcttcgcac cacgctagcg 1440
25 gcgccggc cggccggc tggaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac 1500
aggcgctctt ccgtttctc getcactgac tgcgtcgct cggtcggtcg gctgcggcga 1560
gccccgtatcgat ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620
30 gggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680
ctggcggtttt tccataggct ccgcggccct gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt 1740
35 cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgttttcccc tggaaagctcc 1800
ctcgtgcgtt ctcctgttcc gaccctgcgg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860
tcggaaagcg tggcgcttcc tcatacgatca cgctgttaggt atctcagttc ggtgttaggtc 1920
40 gttcgctcca agctggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 1980
tccggtaact atcgcttgc tcccaacccg gtaagacacg acttatacgcc actggcagca 2040
45 gcccactggta acaggattag cagagcgagg tatgttaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100
tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgcgttcc gcaaacaac caccgctgg 2220
50 agcgggtggtt tttttgttttcaagcagcag attacgcgcgca gaaaaaaaaagg atctcaagaa 2280
gatccttgc tctttctac ggggtctgac gctcagtggaa acgaaaaactc acgttaagg 2340
55 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttccacccatc tccctttaaa ggccggccgc 2400
ggccgcgcaaa agtcccgctt cgtaaaaatt ttcgtgcgcgt gtgattttcc gccaaaaact 2460
ttaacgaacg ttcgttataa tggtgtcatg accttcacgca cgaagtacta aaattggccc 2520
60 gaatcatcag ctatggatct ctctgtatgc ggcgtggagt ccgacgcgcgt cgatgctgcc 2580
gtcgatttaa aaacgggtatc cggttttttc cgagctctcg atacgacggc cgcgcgcagca 2640
65 tcacgagact gggccagtgc cgcgcgcac ctagaaactc tcgtggcgaa tcttgcgg 2700
ctggctgacg agctgcgtgc tggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
atcagttgcg cctactgcgg tggccgtatt cctcccccggc ctgacccgcg aggacggcgc 2820

gcaaaaatatt gctcagatgc gtgtcggtcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaaacgc 2880
5 cacgccgagg agctggaggc ggcttaggtcg caaatggcgc tggaaagtgcg tcccccgagc 2940
gaaattttgg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcg 3000
gcggtgcccg caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttctgtgtcc gtggccgccc 3060
10 aggacgtgtc agegccgcca ccacatcgac cgaatcggca gcagcgtcg gctcgaaaa 3120
agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaataacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
15 gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa cccccagtc aaacctggga gaaagcgctc 3240
aaaaatgact cttagcggatt cacgagacat tgacacacccg gcctggaaat ttcccgctga 3300
tctgttcgac acccatcccg agctcgcgt gcgatcacgt ggctggacga gccaagaccc 3360
20 ccgcgaattc ctgcgtcacc tggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
cgccagcgtc tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480
25 ggttcaaaat cgcttgcgg tggccagtat gttgtctga cgcaacgcga gcacgcagcc 3540
gtgcttgcac tggacattga tggccgagc caccaggccg gcggggaaaat cgagcacgta 3600
aaccccgagg tctacgcgt tttggagcgc tggccacgc tggaaaaagc gccagcttgg 3660
30 atcggcgtga atccactgag cggaaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720
gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgcctgctgg ctgcaacgcac cgaggaaatg 3780
35 acccgcgttt tcggcgctga ccaggcttt tcacataggc tgagccgtgg ccactgcact 3840
ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gcccagcacatc acgcgttgaa tcgccttagct 3900
gatcttatgg aggttgcgtc catgatctca ggcacagaaa aacctaaaaa acgctatgag 3960
40 caggagttt cttagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaaagca 4020
aaagcacttg ccacgcttga agcaaggctg ccgagcggcc ctgaagcgtc tggagagctg 4080
45 atcgcacggcg tccgtgtcct ctggactgtc ccagggcggt cccgcgtga tgagacggct 4140
tttcgcccacg ctttgcgtt gggataccag ttaaaaagcgg ctgggtgagcg cctaaaaagac 4200
accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggt cggaggaggc 4260
50 cgtgagcctg atctggcgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320
ggctacgtcg cttaaggcca gccagtcgtc cctgctcgatc agacagagac gcagagccag 4380
55 ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaacttagc taagtccagt 4500
caacgacaag ctagggaaat cgcttgacca ttgcagggtt gtttatgact 4560
60 gttgagggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga attttagcgtg 4620
tcacgtcaga ccgtaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680
65 ccgaaagctt cccagtaaat gtgccatctc gttaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740
tctctttgg cctcccttct aggtcgggtc gattgcttt gaagctctt aggggggctc 4800
acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctcgcctcgta aagcgcacaa ggactgctcc 4860

caaagatctt caaagccact gccgcgactg cttcgcgaa gccttgcggc gcgaaattt 4920
5 cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttgcagagat 4980
tggattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgcccc tgatcgccc tgcgacgtt 5040
gcgtcggtgc cgctggttgc gcttggcttgc accgacttga tcagcggccg c 5091
10 <210> 24
<211> 28
<212> DNA
15 <213> Corynebacterium glutamicum
<220>
<223> SEQ_ID_24
20 <400> 24
gcgcggtacc tagactcacc ccagtgct 28

<210> 25
<211> 30
25 <212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
<220>
<223> SEQ_ID_25
30 <400> 25
ctctactagt ttagatgttag aactcgatgt 30

35 <210> 26
<211> 6349
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
40 <220>
<223> SEQ_ID_26_PCLIK5MCS_PMETA_META

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (42)..(177)
<223> PmetA

<220>
<221> misc_feature
50 <222> (178)..(1311)
<223> metA

<220>
<221> misc_feature
55 <222> (1727)..(2518)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (2785)..(3645)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
65 <222> (3791)..(4465)
<223> Ori-Ec (pMB) complement

<220>

<221> misc_feature
<222> (4799)..(5920)
<223> Rep Protein

5 <400> 26
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggccccgtac ctagactcac cccagtgttt 60
aaagcgctgg gttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120
10 tccatataaca ctggacgaag ttttagtctt gtccacccag aacaggcggt tattttcatg 180
cccaccctcg cgcccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcgggtatgt ctccaccgaa 240
15 gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctggggtaa ataccgcgt 300
gataaaagaag gacgcagcaa tgtcggttgc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360
gcagccgatt ggtgggctga ctgtcggtt cccggaaag ccatcaacac tgatatttac 420
20 tgcgtgatct gtaccaaacgt catcggttgt tgcaacggtt ccacccggacc tggctccatg 480
catccagatg gaaatttctg ggtaatcgc ttcccccaca cgtccattcg tgatcaggta 540
25 aacgccgaaa aacaatttctt cgacgcactc ggcatcacca cggtegeccgc agtacttgg 600
ggttccatgg gtggtgcccg cacccttagag tgggcccggaa tgtacccaga aactgttggc 660
gcagctgcgtt ttcttgcagt ttctgcacgc gccagcgctt ggcaaatcgg cattcaatcc 720
30 gccccaaatata aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgaacgca tcgcccaccc cacctaccgt 840
35 ggcgaacttag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaacccactc 900
ggtccttacc gcaagcccgaa ccagcgcttc gccgtggaaat cctacttggaa ctaccaagca 960
gacaagcttag tacagcgatcg cgacgcccggc tcctacgtct tgctcaccga cgccctcaac 1020
40 cgccacgaca ttggtcgcga cccggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080
ccagtccttgcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140
45 ctctccagaa acctggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgtcggccac 1200
gatgcttcc tcaccgaaatg ccgcggaaatg gatcgcatcg tgaggaaactt cttcagccctc 1260
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgatgt tctacatcta aactagttcg 1320
50 gacctaggaa tatcgacatcgatgtc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380
agacccggaa tttaaatcgc tagcgggctg cttaaggaaag cgaaacacgt agaaaggccag 1440
55 tccgcagaaa cgggtgtac cccggatgaa tgctcgtac tgggttatct ggacaaggaa 1500
aaacgcacgc gcaaaagagaa agcaggttagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560
ctggggcggtt ttatggacag caagcgaaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620
60 ggttggaaag ccctgcaaaatg taaaactggat ggcttttttgcgttcccg cggccaaaggaa tctgtatggcg 1680
cagggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctgcgttca ttgaacaaga 1740
tggattgcac gcaggttctc cggccgttgcgttcccg ggtggagagg ctatcggttct atgactggc 1800
65 acaacagaca atcggtgttgcgttcccg cgtgttcccg cgtgtcagcgc aggggcgc 1860
ggttctttttt gtcaagacccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920

gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 1980
5 tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggate tcctgtcata 2040
tcaccttgcct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100
gcttgatccg gctacccgtcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgatcg agcgagcacg 2160
10 tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220
cgccgcagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgcata cccgacggcg aggatctcg 2280
15 cgtgaccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gctttctgg 2340
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2400
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460
20 tatacgccgct cccgattcgc agcgatcgc ctcttatcgc cttttgacg agttttctg 2520
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580
25 ttcgattcca cccgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgaaaaat cccggacgccc 2640
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcaca cgctagcgcc 2700
gccccggcccg gcccgggtgt aaataccgca cagatgcgta aggagaaaaat accgcatcag 2760
30 gcgctttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgcgtcg gtcgttcggc tgcggcgagc 2820
ggtatcagct cactcaaagg cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880
35 aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaaagg cccgcgttgct 2940
ggcgtttttc cataggctcc gccttcgtga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000
gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060
40 cgtgcgcctt cctgtccga ccctgcgcgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcactc ctgttaggtat ctcagtttcgg ttaggttgt 3180
45 tcgctccaag ctgggctgtg tgacgaaacc ccccggttcag cccgaccgcgt gcgccttatac 3240
cggttaactat cgttttgagt ccaacccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300
cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttagggcggt gctacagagt tcttgaagtg 3360
50 gtggcctaactacggctaca cttagaaggac agtattttgtt atctgcgcgc tgctgaagcc 3420
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgcgtggtag 3480
55 cgggtgttttttttgcataaggatcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 3540
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac gttaaaggat 3600
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaagg ccggccgcgg 3660
60 ccgcgcggaaag tccccgttcg tgaaaatttt cgtgcgcgt gatttccgc caaaaacttt 3720
aacgaacgtt cggtataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780
65 atcatcagct atggatctct ctgtatgtcgc gctggagtcc gacgcgcgtcg atgtgcgcgt 3840
cgatttaaaa acgggtatcg gattttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900
acgagactgg gccagtgccg cgagcgaccc agaaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 3960

ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020
5 cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgcg gacggcgccc 4080
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcaca acaaacgcaca 4140
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200
10 aattttggcc atggcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcggtggc 4260
ggtgccccca ggcacatgacaa acatcgtaaa tgccgcgtt cgtgtgcgt ggcgcggcc 4320
15 gacgtgtcag cgccgccacc acctgcacccg aatcggcagc agcgtgcgc gtcgaaaaag 4380
cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaataacctg aaaaatgtt aacgcggcc 4440
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgtctcaa 4500
20 aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc 4560
tgttcgacac ccattcccgag ctcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgcgc gaagaccgc 4620
25 gccaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgccgacttcg 4680
ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg 4740
ttcaaaatcg cttgccccgtt gccagttatgt tgctctgacg cacgcgcgc acgcagccgt 4800
30 gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
ccccgaggcc tacgcgatcc ttggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagttggat 4920
35 cggcgtgaat ccactgagcg gaaaaatgcc gctcatctgg ctcattgatc cgggttatgc 4980
cgccagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgcaccc agaaatgac 5040
ccgcgttttc ggcgctgacc aggcgttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
40 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220
45 ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280
agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgcgcgt gaagcgtctg gagagctgat 5340
cgacggcgcc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt 5400
50 tcgcccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggtt ggtgagcgcc taaaagacac 5460
caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggctg gaggaggccg 5520
55 tgagcctgat ctgcccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcac gtgtgcgcgg 5580
ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgatc acagagacgc agagccagcc 5640
gaggcgaaaa gctctggcca ctatggaaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgcgt 5700
60 gaaagaccca aacagtgagt acgcccggac acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttgggt ttatgactgt 5820
65 tgagggagag actggctcggt ggccgacaaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcggccat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
gaaagcttcc cagtaaatgtt gccatctcggtt aggcagaaaaa cggttcccccc gtagggcttc 6000

tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctttga agctctctag gggggctcac 6060
5 accataggca gataacgttc cccaccggct cgccctcgtaa gcgcacaagg actgctccc 6120
aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180
tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcc a gcttcttc accctaaatt cgagagattg 6240
10 gattcttacc gtggaaattc ttgcaaaaaa tcgtcccttg atcgcccttg cgacgttggc 6300
gtcggtgccc ctgggtgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

15 <210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*
20 <220>
<223> SEQ_ID_27

<400> 27
gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30
25

<210> 28
<211> 41
<212> DNA
30 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> SEQ_ID_28
35 <400> 28
cctgaaggcg cgaggggtggg catgtaat ccctccatga g 41

40 <210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
45 <223> SEQ_ID_29

<400> 29
cccaccctcg cgccttcag 19
50

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*
55

<220>
<223> SEQ_ID_30

<400> 30
60 ctgggtacat tgcgcccc 18

<210> 31
<211> 6372
65 <212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<223> SEQ_ID_31_PCLIK5MCS_PGROESMETA

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(179)
<223> Pgro

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (180)..(1313)
<223> metA

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1735)..(2526)
<223> KanR

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (2793)..(3653)
<223> Ori-Ec (pMB) complement

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (3799)..(4473)
<223> Orf1

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (4807)..(5928)
<223> Rep Protein

<400> 31
35 agcggcttaa agtttgctg ccatgtaat ttttagcacc ctcaacagtt gagtgctggc 60
actctcgaaa gtagagtgc aaataggttt tttgacacac agttgttac cccgcacgac 120
ggctgtgctg gaaacccaca accggcacac aaaaaatttt tctcatggag ggattcatca 180
40 tgcccacccct cgccgcattca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtat gtctccacccg 240
aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgcgtgggt gaataccgcg 300
45 tagataaaaga aggacgcagc aatgtcggttc tcattcaaca cgcctcact ggagattcca 360
acgcagccga ttgggtggct gacttgctcg gtcccgaa agccatcaac actgatattt 420
actgcgtat ctgtaccaac gtcattcggtg gttgcaacgg ttccaccgga cctggctcca 480
50 tgcattccaga tggaaatttc tgggttaatc gttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg 540
taaacgccga aaaacaattt ctcgacgcac tcggcatcac cacggcgcc gcagtacttg 600
55 gtggttccat ggggtggcc cgcaccttag agtggccgc aatgtaccca gaaactgttg 660
gcccgcacgc tggcttcgc gtttctgcac gcccgcacgc ctggcaatc ggcattcaat 720
ccgccccaaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat 780
60 cccgcgtccaa cccagccacc ggactcgccg cccggcgacg catgcccac ctcacccacc 840
gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc cccaaagaac gaaaacccac 900
65 tcgggtcccta cccgcacgc gaccagcgct tcggcggtt atcctacttg gactaccaag 960
cagacaagct agtacagcggtt ttcgacgcgg gctcctacgt cttgctacc gacgcctca 1020
accgcacga cattggcgcc gaccgcggag gcctcaacaa ggcaactcgaa tccatcaaag 1080

ttccagtcct tgcgcaggc gtagataccg atattttgtt cccctaccac cagcaagaac 1140
5 acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgatcc cctgtcggcc 1200
acatgtctt cctcaccgaa agccgc当地 tggatcgcat cgtgaggaac ttcttcagcc 1260
tcatctcccc agacgaagac aacccttcga cctacatcgta gttctacatc taacatatga 1320
10 ctagttcggaa cctaggata tcgtcgacat cgatgtctt ctgcgttaat taacaattgg 1380
gatcctctag acccgggatt taaatcgcta gcgggctgct aaaggaagcg gaacacgtag 1440
15 aaagccagtc cgcagaaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg 1500
acaaggaaaa acgcaagcgc aaagagaaaag caggtagctt gcagtggct tacatggcga 1560
tagcttagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc 1620
20 tctggtaagg ttggaaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaggatc 1680
tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcggt tcgcattgatt 1740
25 gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgc当地 tggagaggct attcggctat 1800
gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccccc tggtccggct gtcagcgcag 1860
gggcgc当地 ggccggccgg ttcttttgc caagaccgac ctgtccgggt ccctgaatga actgcaggac 1920
30 gaggcagcgc ggctatcgta gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tggctcgac 1980
gttgtcactg aagcggaaag ggactggctg ctattggcg aagtgc当地 ggaggatctc 2040
35 ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgc当地 2100
ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagc当地aca tcgcattcag 2160
cgagcacgta ctggatgga agccggctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat 2220
40 caggggctcg cgccagccga actgttcgccc aggctcaagg cgccatgccc cgacggc当地 2280
gatctcgctg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccataa tcatggcgaa aatgc当地 2340
45 ttttctggat tcatcgactg tgccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagcg 2400
ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggccggcaat gggctgaccg cttcctcgat 2460
ctttacggta tcgcccgtcc cgattcgcag cgcatcgct tctatcgct tcttgacgag 2520
50 ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgc当地ccc aacctgccc 2580
cacgagattt cgattccacc gccgc当地tct atgaaaggat gggcttcgga atcgatcc 2640
55 gggacgc当地 ctggatgatc ctccagcgc当地 gggatctcat gctggatctc ttgc当地ccacg 2700
ctagcggcgc gccc当地ggc cccgtgtgaa ataccgcaca gatcgtaag gaga当地atac 2760
cgcatcaggc gctctccgc ttccctcgctc actgactcgcc tgcgc当地ggctg cggtccggctg 2820
60 cggc当地ggc tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tattccacaga atcaggggat 2880
aacgc当地ggaa agaacatgtg agcaaaaaggc cagcaaaaagg ccaggaaaccg taaaaaggcc 2940
gcgttgc当地gg taggtccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 3000
65 tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgat tccccctgg 3060
agctccctcg tgcgc当地cc tggccgacc ctgccc当地tta ccggataccct gtccgc当地ttt 3120

ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 3180
5 taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 3240
gccttatccg gtaactatcg tctttagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 3300
gcagcagcca ctggtaaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 3360
10 ttgaagtggt ggcctaacta cggtacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 3420
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctttt gatccggcaa acaaaccacc 3480
15 gctggtagcg gtggttttt tgtttgcag cagcagatta cgccgagaaa aaaaggatct 3540
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggAACGA aaactcacgt 3600
taagggattt tggcatgag attatcaaaa agatcttca cctagatcct tttaaaggcc 3660
20 ggccgcggcc gcgaaagtc ccgttcgtg aaaatttcg tgccgcgtga tttccgcca 3720
aaaactttaa cgaacgttcg ttataatggt gtcatgacct tcacgacgaa gtactaaaat 3780
25 tggcccgaat catcagctat ggatctctt gatgtcgccg tggagtccga cgccgtcgat 3840
gctgccgtcg attaaaaac ggtgatcgga ttttccgag ctctcgatac gacggacgacg 3900
ccagcatcac gagactgggc cagtgcgcg agcgacctag aaactctcgat ggcggatctt 3960
30 gaggagctgg ctgacgagct gcgtgctcgg ccagcgccag gaggacgcac agtagtggag 4020
gatgcaatca gttgcgccta ctgcgggtggc ctgattcctc cccggcctga cccgcgagga 4080
35 cggcgcgcaa aatattgctc agatgcgtgt cgtgccgcag ccagccgcga gcgcccaac 4140
aaacgcccacg ccgaggagct ggaggcggct aggtcgcaaa tggcgctggaa agtgcgtccc 4200
ccgagcggaaa ttttggccat ggtgatcgaca gagctggaaag cggcagcgg aattatcg 4260
40 atcgtggcgg tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaatg ccgcgtttcg tgtgccgtgg 4320
ccgcccagga cgtgtcagcg ccgcaccac ctgcacccaa tcggcagcgg cgtcgccgt 4380
45 cgaaaaagcg cacaggcggc aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttggaa 4440
cgccccgtga gcggtaactc acaggcgtc ggctaacccc cagtccaaac ctgggagaaa 4500
gchgctcaaaa atgactctag cggattcagc agacattgac acacccgcct ggaaatttc 4560
50 cgctgatctg ttgcacaccc atcccgagct cgccgtgcga tcacgtggct ggacgagcga 4620
agaccgcgcg gaattcctcg ctcacctggg cagagaaaat ttccaggca gcaagacccg 4680
55 cgacttcgcc agcgcttggc tcaaagaccc ggacacggag aaacacagcc gaagttatac 4740
cgagttgggtt caaaatcgct tgcccggtgc cagttatggc ctctgacgcga cgccgac 4800
gcagccgtgc ttgtccctggaa cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg gaaaatcg 4860
60 cacgtaaacc ccgagggtcta cgcgatttt gaggcgctggg cacgcctggaa aaaagcgcca 4920
gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcacgtggct cattgatccg 4980
65 gtgtatgcgg cagcaggcat gaggcagcccg aatatgcgcg tgctggctgc aacgaccgag 5040
gaaatgaccc gcgtttcgg cgctgaccag gcttttcac ataggctgag ccgtggccac 5100
tgcactctcc gacgatccca gccgtaccgc tggcatgccc agcacaatcg cgtggatcgc 5160

ctagctgatc ttatggaggt tgctcgcatg atctcaggca cagaaaaacc taaaaaaacgc 5220
5 tatgagcagg agtttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg 5280
gaagcaaaag cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgcgcgtga agcgtctgga 5340
gagctgatcg acggcgtccg tgtcctctgg actgctccag ggcgtgccgc ccgtgatgag 5400
10 acggctttc gccacgctt gactgtggga taccagttaa aagccgctgg tgagcgcccta 5460
aaagacacca agggtcatcg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca ggccggtcgga 5520
15 ggaggccgtg agcctgatct gccgcccggac tgtgaccgccc agacggattg gccgcgacgt 5580
gtgcgcggct acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctcgtcagac agagacgcag 5640
agccagccga ggcgaaaagc tctggccact atggaaagac gtggcgtaa aaaggccgca 5700
20 gaacgctgga aagacccaaa cagtgagtagc gccccgagcac agcgagaaaa actagctaag 5760
tccagtcaac gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt 5820
25 atgactgttg agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt 5880
agcgtgtcac gtcagaccgt gaatagagca cttaaggctt gcgggcattt aacttccacg 5940
aggacgcccga aagctccca gtaaatgtgc catctcgtag gcagaaaaacg gttccccgt 6000
30 agggctcttc tcttggcctc ctttcttaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg 6060
gggctcacac cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac :6120
35 tgctccaaa gatcttcaaa gccactgccc cgactgcctt cgcgaaagcct tgccccgcgg 6180
aaatttcctc caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaag cttcttcac cctaaattcg 6240
agagatttggaa ttcttaccgt gggaaattttt cgccaaaatc gtccctgtat cgcccttgt 6300
40 acgttggcgt cggtggcgtt ggttgcgtt ggcttgaccg acttgatcag cggccgcctcg 6360
atttaaatct cg 6372

45 <210> 32
<211> 29
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

50 <220>
<223> SEQ_ID_32

<400> 32
ggatctagag ttctgtaaaa aacaccgtg 29

55 <210> 33
<211> 29
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_33

60 <400> 33
gcgactagtg ccccacaaat aaaaaacac 29

```
<210> 34
<211> 5156
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
5 <220>
<223> SEQ_ID_34

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (121 )..(190 )
<223> GroEL Terminator

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (534 )..(1325 )
<223> KanR

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1592 )..(2452 )
<223> Ori-EC(pMB) complement

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (2598 )..(3272 )
<223> Orf1

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (3606 )..(4727 )
<223> Rep Protein

35 <400> 34
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagtt 60
cggacctagg gatatcgatcg acatcgatgc ttttctgcgt taattaacaa ttgggatcct 120
40 ctagagttct gtgaaaaaca ccgtggggca gtttctgcct cgccgtgttt ttatattgtg 180
gggcactaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 240
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc gnatgaatgt cagctactgg gctatctgga 300
45 caaggaaaaa cgcaagcgc aagagaaaagc agtagcttg cagtggctt acatggcgat 360
agcttagactg ggcgggtttt tggacagcaa gccaaccgga attgccagct ggggcgcct 420
50 ctggtaaggt tggaaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgcgg ccaaggatct 480
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcggtt cgcatgattg 540
aacaagatgg attgcacgca gtttctccgg ccgcgtgggt ggagaggcta ttcggctatg 600
55 actgggcaca acagacaatac ggctgctctg atgcccggctg tcagcgcagg 660
ggcgccccgt tcttttgtc aagacccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 720
60 aggccagcgcg gctatcgatgg ctggccacga cggcggttcc ttgcgcagct gtgcgcgacg 780
ttgtcactga agcggaaagg gactggctgc tattggcga agtgcggggg caggatctcc 840
tgtcatctca ccttgccttcc gccgagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 900
65 tgcatacgtctgatccggatccat tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 960
gagcacgtac tcggatggaa gccggcttgc tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 1020
```

aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc ggcgcattcccc gacggcgagg 1080
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtgaa aatggccgct 1140
5 tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 1200
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttccctcggtc 1260
10 tttacggtat cgccgcctcc gattcgcagc gcatcgccctt ctatcgccctt cttgacgagt 1320
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgcacgccc acctgcccate 1380
acgagatttc gattccaccc cgcccttcta taaaagggttgg ggttcggaa tcgtttccg 1440
15 ggacgcccggc tggatgatecc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 1500
tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa tacccgcacag atgcgttaagg agaaaaatacc 1560
20 gcatcaggcg ctcttcggct tcctcgctca ctgactcgct ggcgcggcgtc gttcggtc 1620
ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 1680
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1740
25 cgttgctggc gttttccat aggtccggcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1800
caagtcagag gtggcgaaac ccgcacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa 1860
30 gtccttcgt ggcgccttcgt gttccgaccc tgccgcttac cggataacctg tccgccttc 1920
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgcgtg taggtatctc agttcggtgt 1980
aggtcggtcg ctccaaagctg ggctgtgtgc acgaaaccccc cgttcagcccc gaccgctgctg 2040
35 ctttatccgg taactatcgt cttgagtcctt acccggttaag acacgactta tcgcccactgg 2100
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggccgtgtc acagagttct 2160
40 tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatac tgcgcctcgtc 2220
tgaagccagt taccccgaa aaaagagttt gtagctcttgc atccggcaaa caaaccaccc 2280
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcagaac agcagattac ggcgcagaaaa aaaggatctc 2340
45 aagaagatcc tttgatcttt tctacgggggt ctgacgctca gtggAACGAA aactcacgtt 2400
aagggattttt ggtcatgaga ttatcaaaaaa ggatcttac ctagatcctt ttaaaggccg 2460
50 gcccggccg cgccaaagtcc cgcttcgtga aaattttcgat ggcgcgtgat ttccgcctaa 2520
aaactttaac gaacgttcgt tataatggtg tcatgacccctt cagcacaag tactaaaatt 2580
ggcccgaatc atcagctatg gatctctctg atgtcgctgt ggagtcgcac ggcgcgtatg 2640
55 ctggccgtcga tttaaaaaacg gtgatcggtat tttccggcgt tctcgatacg acggacgcgc 2700
cagcatcacc agactggcc agtgcggcga ggcgcctaga aactctcgatg ggcgcgttt 2760
60 aggagctggc tgacgagctg cgtgcgtccgc cagcgcagg aggacgcaca gtgtggagg 2820
atgcaatcag ttgcgcctac tgccgtggcc tgatccctcc ccggcctgac ccgcgaggac 2880
ggcgccaaa atattgctca gatgcgtgtc gtgcggcagc cagccgcgag cgccccaaca 2940
65 aacgccacgc cgaggagctg gaggccgtat ggtcgaaat ggcgcgtggaa gtgcgtcccc 3000
cgagcgaaat tttggccatg gtcgtcacag agctggaaagc ggcagcgcaga attatcgccgaa 3060

tcgtggcggt gcccgcaggc atgacaaaaca tcgtaaatgc cgcgttcgt gtgccgtggc 3120
cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc gtcgcgcgtc 3180
5 gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa aatgttgaac 3240
gccccgtgag cggtaactca cagggcgtcg gctaaccccc agtccaaacc tgggagaaaag 3300
10 cgctaaaaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg gaaattttcc 3360
gctgatctgt tcgacaccca tcccagcgc gcgctgcgt cacgtggctg gacgagcga 3420
gaccgcccgcg aattcctcgc tcacctggc agagaaaatt tccagggcag caagacccgc 3480
15 gacttcgcga gcgcttggat caaagacccg gacacggaga aacacagccg aagttatacc 3540
gagttgggtc aaaatcgctt gcccggtgcc agtatgtgc tctgacgcac gcgcagcacg 3600
20 cagccgtgct tgtcctggac attgatgtgc cgagccacca ggccggcggg aaaatcgagc 3660
acgtaaaccc cgaggtctac gcgattttgg agcgctggc acgcctggaa aaagcgccag 3720
cttggatcgg cgtaatcca ctgagcggga aatgccagct catctggctc attgatccgg 3780
25 tgtatgccgc agcaggcatg agcagcccgaa atatgcgcct gctggctgca acgaccgagg 3840
aaatgacccg cgtttccggc gctgaccagg cttttcaca taggctgagc cgtggccact 3900
30 gcaactctccg acgatcccg ccgtaccgct ggcacatccca gcacaatcgc gtggatcgcc 3960
tagctgatct tatggaggtt gctcgcatga tctcaggcac agaaaaaacct aaaaaacgct 4020
atgagcagga gttttctagc ggacgggcac gtatcgaagc ggcaagaaaa gccactgcgg 4080
35 aagcaaaagc acttgcacag cttgaagcaa gcctgccgag cgccgctgaa gcgtctggag 4140
agctgatcga cggcgtccgt gtcctctgga ctgctccagg gcgtgccgccc cgtgatgaga 4200
40 cggctttcg ccacgctttg actgtggat accagttaaa agcggctggt gagcgcctaa 4260
aagacaccaa gggtcatcga gcctacgagc gtgcctacac cgtcgctcag gcggtcggag 4320
gaggccgtga gcctgatctg cccggact gtgaccgcca gacggattgg cccgcacgtg 4380
45 tgcgccgcta cgtcgctaaa gcccagccag tcgtccctgc tcgtcagaca gagacgcaga 4440
gccagccgag gcgaaaagct ctggccacta tgggaagacg tggcggtaaa aaggccgcag 4500
50 aacgctggaa agacccaaac agtgagtacg cccgagcaca gcgagaaaaa ctagctaagt 4560
ccagtcaacg acaagctagg aaagctaaag gaaatcgctt gaccattgca gttgggtta 4620
tgactgttga gggagagact ggctcggtgc cgacaatcaa tgaagctatg tctgaattta 4680
55 gcgtgtcacg tcagaccgtg aatagagcac ttaaggtctg cgggcattga acttccacga 4740
ggacgcccggaa agcttcccg taaatgtgcc atctcgtagg cagaaaacgg ttccccgtaa 4800
60 gggctctctt cttggcctcc tttctaggtc gggctgatgg ctcttgaagc tctctagggg 4860
ggctcacacc ataggcagat aacgttcccc accggctcgc ctcgtaaagcg cacaaggact 4920
gctcccaaag atcttcaaag ccactgccc gactgccttc gcgaagcctt gccccgcgg 4980
65 aatttcctcc accgagttcg tgcacacccc tatgccaagc ttcttcacc ctaaattcga 5040
gagattggat tcttaccgtg gaaattcttc gcaaaaaatcg tccccctgatec gcccattgcga 5100

cgttggcgtc ggtgccgctg gttgcgcggc gcttgaccga cttgatcagc ggccgc 5156

5 <210> 35
<211> 30
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

10 <220>
<223> SEQ_ID_35

<400> 35
gagacatatg cccaccctcg cgccattcagg 30

15 <210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

20 <220>
<223> SEQ_ID_36

<400> 36
ctctactagt ttagatgttag aactcgatgt 30

25 <210> 37
<211> 6287
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

30 <220>
<223> SEQ_ID_37_PCLIK5MCS_META_OHNE_STARTCODON

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(1184)
<223> MetA without startcodon

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1252)..(1321)
<223> GroEL Terminator

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1665)..(2456)
<223> KanR

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (2723)..(3583)
<223> Ori-EC(pMB) complement

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (3729)..(4403)
<223> Orf1

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (4737)..(5858)
<223> REP Protein

65 <400> 37
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgcccaccc 60

30

tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcggtga tgtctccacc gaagccggag 120
caatcattac aaacgctgaa atcgctatac accgctgggg tgaataccgc gtagataaag 180
5 aaggacgcag caatgtcggt ctcatcgAAC acgcgcctcac tggagattcc aacgcagccg 240
atgggtggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt tactgcgtga 300
10 tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcAAC gttccaccgg acctggctcc atgcacccag 360
atggaaattt ctgggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgtacAG gtAAACGCCG 420
aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcaGtactt ggtggttcca 480
15 tgggtggtgc ccgcaccccta gagtgggccg caatgtacCC agaaactgtt ggCGCAGCTG 540
ctgttcttgc agtttctgca cgcGCCAGCG cctggcaat cggcattCAA tccGCCAA 600
20 ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggca acGtactacgaa tccggctgca 660
acccagccac cggactcgGC gCcGCCGAC gcatgcCcCA cctcacctac cgtggcGAAC 720
tagaaatcga cgaacgcTTc ggcaccaaaAG cccAAAAGAA cgAAAACCCA ctcggTcccT 780
25 accgcaagcc cgaccagcgc ttgcgcgtgg aatcctactt ggactaccaa gcagacaAGC 840
tagtacAGCG ttgcacgCC ggctcctacG tcttgcTcAc cGacGCCCTC aaccGCCACG 900
30 acattggtgc cgaccgcggA ggcctcaaca aggcaCTcGA atccatCAA gttccAGTCC 960
ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt acccctacca ccAGcaAGAA cacctctCCA 1020
gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaaa aaatcgTATC ccctgtcGGC cacgatgTT 1080
35 tcctcaccga aagCCGCCAA atggatcgca tcgtgaggAA cttttcAGc ctcatctCCC 1140
cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaaaactagt tcggacctAG 1200
40 ggatatcgTC gacatcgatG ctcttctgcG ttaattaACA attggatCC tctagAGttC 1260
tgtgaaaaAC accgtggggc agtttctgCT tcgcggTgtt ttttattttgt ggggcaCTAG 1320
acccgggatt taaatcgCTA gCGGGCTGCT aaaggaAGCG gaacacGTAG aaAGCCAGTC 1380
45 cgcagaaACG gtgctgacCC cggatGAATG tcagctactG ggctatCTGG acaAGGGAAA 1440
acgcaAGcGC AAAGAGAAAG caggtAGCTT gcAGTGGGCT tacatGGCGA tagCTAGACT 1500
50 gggcggTTTt atggacAGCA agcgaACCGG aattGCCAGC tggggcGCCc tctggtaagg 1560
ttgggaAGCC ctgcaAAAGTA aactggatGG ctttcttgcC gccaaggatc tgatggcga 1620
ggggatcaAG atctgatCAA gagacaggat gaggatcgTT tcgcAtgatt gaacaAGATG 1680
55 gattgcacgc aggttctccG gcccgttggg tggagAGGCT attccgctat gactggcAC 1740
aacagacaAT cggctgCTt gatGCCGCCG tggccggCT gtcagcgcAG gggcGCCGG 1800
60 ttctttttgt caagaccgac ctgtccggTG ccctgaatGA actgcaggAC gaggcAGcGC 1860
ggctatcGTG gctggccACG acgggcgtTC cttgcgcAGC tggctcgAC gttgtactG 1920
aagcggGAAG ggactggCTG ctattggcG aagtGCCGG gcaGGatCTC ctgtcatCTC 1980
65 accttgctCC tgccgagAAA gtatccatCA tggctgatGC aatgcggcGG ctgcatacGC 2040
ttgatccggc tacctgCCCA ttgcaccACC aagcgaAAACA tcgcAtcGAG cgacacGta 2100

ctcgatggaa agccgggttt gtcgatcagg atgatctggaa cgaagagcat caggggctcg 2160
cgccagccga actgttgcgc aggctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgatcg 2220
5 tgacctatgg cgatgcctgc ttgccataa tcatgggtggaa aaatggccgc ttttctggat 2280
tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc 2340
10 gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg ctgcctcgat ctttacggta 2400
tcgcccgtcc cgattcgcag cgcatcgct tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag 2460
cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccc cacgagattt 2520
15 cgattccacc gcccgccttct atgaaagggtt gggcttcggaa atcgaaaaatcc gggacgcccgg 2580
ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttgcgcacgg ctagcggcgc 2640
20 gccggccggc ccgggtgtgaa ataccgcaca gatgcgttaag gagaaaatac cgcatcaggc 2700
gtcttcggc ttccctcgatc actgactcg tgcgcctcgat cgttcggctg cggcgagcg 2760
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggat tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 2820
25 agaacatgtg agcaaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 2880
cgaaaaatcc taggctccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtca 2940
30 ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgat tccccctggaa agctccctcg 3000
tgcgcctcc tttcccgacc ctgcgcctta ccggataacct gtcgcctt ctcccttegg 3060
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgat gtaggtatct cagttcggat taggtcgatc 3120
35 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 3180
gtaaatatcg tctttagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 3240
40 ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggatc tacagagtcc ttgaagtgg 3300
ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgcctcg ctgaagccag 3360
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagcttt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 3420
45 gtggttttt tttttgcag cagcagatta cgccgcggaaa aaaaggatct caagaagatc 3480
ctttgatctt ttctacgggg tctgcacgc agtggAACGA aaactcacgt taagggattt 3540
tggcatgag attatcaaaa aggatctca cctagatcct tttaaaggcc gcccggcc 3600
50 gcgcaaaatgc ccgttcgtg aaaatttcg tgccgcgtga tttccgcca aaaactttaa 3660
cgaacgttcg ttataatggt gtcacgatcc tcacgacgaa gtactaaaat tggccgaaat 3720
55 catcagctat ggatctctct gatgtcgccg tggagtcggaa cgccgcgtat gctgcgcgtcg 3780
atttaaaaac ggtgatcgaa ttttccggat ctctcgatcc gacggacgcg ccagcatcac 3840
60 gagactgggc cagtgccgcg agcgacccatg aaactctcgat ggcggatctt gaggagctgg 3900
ctgacgagct gctgtctcgat ccagcgccag gaggacgcac agtagtggag gatgcaatca 3960
gttgcgccta ctgcggatggc ctgatttcctc cccggcctga cccgcggatggc cggcgcccaa 4020
65 aatattgctc agatgcgtgt cgtgcgcag ccagccgcga gcgcgcacaa acacgcac 4080
ccgaggagct ggaggcggtt aggtcgcaaa tggcgctggaa aqgtgcgtccc ccgagcgaaa 4140

ttttggccat ggtcgtcaca gagctggaag cggcagcag aattatcgcg atcggtgcgg 4200
tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaatg ccgcgttgc tgtgccgtgg ccgcccagga 4260
5 cgtgtcagcg cgcaccac ctgcaccgaa tcggcagcag cgtcgcgcgt cgaaaaagcg 4320
cacaggcgc aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttcaa cgccccgtga 4380
10 gcggtaactc acagggcgtc ggctaaccac cagtccaaac ctgggagaaa ggcgtcaaaa 4440
atgactctag cggattcagc agacattgac acaccggct gaaattttc cgctgatctg 4500
ttcgacaccc atcccgagct cgcgctgcga tcacgtggct ggacgagcga agaccggcgc 4560
15 gaattcctcg ctcacctggg cagagaaaaat ttccaggcga gcaagaccccg cgacttcgccc 4620
agcgcttggaa tcaaagaccc ggacacggag aaacacagcc gaagttatac cgagttgggt 4680
20 caaaatcgct tgcccggtgc cagtatgttgc cttgtacgc cgcgcagcac gcagccgtgc 4740
ttgtcctggaa cattgtatgtc ccgagccacc aggccggcgg gaaaatcgag cacgtaaacc 4800
ccgaggtcta cgcgattttg gagcgcgtggg cacgcctggaa aaaagcgcca gcttggatcg 4860
25 gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcattctggct cattgtacgc gtgtatgccg 4920
cagcaggcat gagcagcccg aatatgcgcc tgctggctgc aacgaccgag gaaatgaccc 4980
30 gcgttttgcg cgctgaccag gcttttac ataggctgag ccgtggccac tgcactctcc 5040
gacgatccca gccgtaccgc tggcatgccc agcacaatcg cgtggatcgc ctagctgatc 5100
ttatggaggt tgctcgcatg atctcaggca cagaaaaacc taaaaaacgc tatgagcagg 5160
35 agtttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg gaagcaaaag 5220
cacttgcacac gcttgaagca agcctgcccga gcgcgcgtga agcgtctggaa gagctgatcg 5280
40 acggcgtccg tgcctctgg actgctccag ggcgtgcgc ccgtgatgag acggctttc 5340
gccacgctt gactgtggaa taccagttaa aagcggctgg tgagcgccta aaagacacca 5400
agggtcatcg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca ggcgcgtggaa ggaggccgtg 5460
45 agcctgatct gccgcggac tggaccgc agacggatttgc ggcgcgacgt gtgcgcggct 5520
acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctcgtcagac agagacgcag agccagccga 5580
50 ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa aaaggccgca gaacgctggaa 5640
aagacccaaa cagttagtac gcccgagcac agcgagaaaa actagctaag tccagtcaac 5700
gacaagctag gaaagctaaa ggaatcgct tgaccattgc aggttggttt atgactgtt 5760
55 agggagagac tggctcggtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt agcgtgtcac 5820
gtcagaccgt gaatagagca cttaaaggct gcgggcattt aacttccacg aggacgcccga 5880
60 aagcttccca gtaaatgtgc catctcgtag gcagaaaaacg gttccccgtt agggctctc 5940
tcttggccctc cttcttaggt cgggctgatt gctcttgcgtgg ctctcttaggg gggctcacac 6000
cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac tgctcccaa 6060
65 gatcttcaaa gccactgccc cgactgcctt cgcgaaacct tgcccccggg aaatttccctc 6120
caccgagttc gtgcacaccc cttatgcacag cttcttcac cttaaattcg agagattggaa 6180

ttcttaccgt ggaaattctt cgaaaaatc gtccctgat cgccctgcg acgttggcgt 6240
cggtgccgct ggttgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgc 6287

5 <210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

10 <220>
<223> SEQ_ID_38_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1701

<400> 38
15 gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

<210> 39
<211> 32
20 <212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> SEQ_ID_39_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1828

25 <400> 39
ctctcatatg caatccctcc atgagaaaaa tt 32

30 <210> 40
<211> 40
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

35 <220>
<223> SEQ_ID_40_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1831

<400> 40
ctctcatatg cgcggccgca atccctccat gagaaaaatt 40

40 <210> 41
<211> 39
<212> DNA
45 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> SEQ_ID_41_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1832

50 <400> 41
ctctcatatg caatctctcc atgagaaaaa ttttgttg 39

<210> 42
55 <211> 39
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> SEQ_ID_42_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1833

<400> 42
60 ctctcatatg caatctcctc atgagaaaaa ttttgttg 39

65 <210> 43
<211> 39
<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum
<220>
5 <223> SEQ_ID_43 OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1834
<400> 43
ctctcatatg caatcccttc atgagaaaaaa ttttgttg 39

10 <210> 44
<211> 2961
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

15 <220>
<223> SEQ_ID_44 PBS_KS+

<400> 44
20 ctaaattgtt agcgtaata ttttgttaaa attcgctta aattttgtt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggttg agtgttgc cagttggaa caagagtcca ctataaaaga acgtggactc 180
25 caacgtcaaa gggcgaaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacgat ttttgggt cgaggtgccc taaagcacta aatcggaaacc ctaaaggag 300
30 cccccgattt agagtttgc gggaaagcc ggcaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa 360
agcgaaagga gcggcgcta gggcgctggc aagttagcg gtcacgctgc gcgttaaccac 420
cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcttcc cattcgccat tcaggctgc 480
35 caactgttgg gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta ttacgcccgc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgcccaggg ttttcccgat caccgacgtt 600
40 taaaacgacg gccagtggc ggcgtataa cgtactacta tagggcgaat tggagctcca 660
ccgcgggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatata 720
gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg gcccggtacc cagctttgt tcccttttagt 780
45 gagggtaat tgcgcttg gctaatcat ggtcatagct gttccctgtg tgaaattgtt 840
atccgctcac aattccacac aacatacggag ccggaaagcat aaagtgtaaa gcctgggtg 900
50 cctaattgagt gagctaaactc acattaattt cggtgcgtc actgcccgt tccctgtgc 960
gaaacctgtc gtgcctgtc cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggccgtttgc 1020
gtattggcg ctcttcgct tcctcgctca ctgactcgct ggcgtcggtc gttccgtgc 1080
55 ggcgagcggt atcagtcac tcaaaggcggt taatacgtt atccacagaa tcagggata 1140
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1200
60 cgttgctggc gttttccat aggctccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt 1260
caagtcaagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa 1320
gctccctcgat ggcgtctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgccttc 1380
65 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgtc taggtatctc agttcggtgt 1440
aggtcggtcg ctccaaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagcccc gaccgctgcg 1500

ccttatccgg taactatcg tttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 1560
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 1620
5 tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatac tgccgtctgc 1680
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctctt atccggcaaa caaaccaccc 1740
10 ctggtagcgg tggttttttt gtggcaagc agcagattac ggcgcagaaaa aaaggatctc 1800
aagaagatcc ttgtatctt tctacgggt ctgacgctca gtggAACGAA aactcacgtt 1860
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa 1920
15 aatgaagttt taaatcaatc taaagtataat atgagtaaac ttggctgtac agttaccaat 1980
gcttaatcag tgagggacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct 2040
20 gactccccgt cgttagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg 2100
caatgataacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2160
ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgccctccatc cagtctattta 2220
25 attgttgcgg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagttgcgc aacgttgtt 2280
ccattgtac aggcatcggt gtgtcacgct cgtcggttgg tatggcttca ttcagctccg 2340
30 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgtat ccccatgtt gtcaaaaaaa gcggttagct 2400
ccttcggtcc tccgatcggtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta 2460
tggcagcaact gcataattct cttaactgtca tgccatccgtt aagatgttt tctgtgactg 2520
35 gtgagtaactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg ggcgaccgagtg tgctttgc 2580
cgccgtcaat acggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtgt ctcatcattt 2640
40 gaaaacgttc ttccggcga aaactctcaa ggtatctacc gctgttgaga tccagttcga 2700
tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcgttctg 2760
ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat 2820
45 gttgaataact catabcttc cttttcaat attattgtatc catttatcag gtttattgtc 2880
tcatgagccg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataagggtt ccgtttttttt 2940
50 catttccccg aaaagtgcac c 2961

<210> 45
<211> 6431
<212> DNA
55 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_45_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1828_META

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899)
<223> P1701/1828

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
<223> MetA without startcodon

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (2104 )..(2173 )
5 <223> GroEL Terminator

<220>
<221> misc_feature
<222> (2517 )..(3308 )
10 <223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3575 )..(4435 )
15 <223> Ori-EC(pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4581 )..(5255 )
20 <223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (5589 )..(279 )
25 <223> REP Protein

<400> 45
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggta aaaaggccgc agaacgctgg 60
30 aaagacccaa acagttagta cgcccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
cgacaagcta ggaaagctaa aggaatcgc ttgaccattt caggttggtt tatgactgtt 180
35 gagggagaga ctggctcgta gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggc tgccggcatt gaacttccac gaggacgccc 300
aaagcttccc agtaaatgtt ccatttcgtt ggcagaaaaac gttcccccg tagggctct 360
40 ctcttggcct ctttctagg tcgggctgat tgctttgaa gctctctagg ggggctcaca 420
ccataggcag ataacgttcc ccacccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgttccaa 480
45 agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgcggcgcg gaaatttccct 540
ccaccgaggc cgtgcacacc cctatgcca gttctttca ccctaaatttcc gagagattgg 600
attcttaccg tggaaattct tcgaaaaat cgtccccctga tcgcccattgc gacgttggcg 660
50 tcgggtccgc tggttgcgt tggcttgacc gacttgatca gcggccgctc gattnaaatc 720
tcgagcggct taaaagttgg ctgccccatgtt aatttttagc accctcaaca gttgagtgtt 780
55 ggcactctcg ggggttagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccggcgcac 840
gacggctgtg ctggaaaccc acaacccggca cacacaaaat ttttctcatg gagggtttgc 900
atatgcccac cctcgccgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggt gatgtctcca 960
60 ccgaagccgg agcaatcatt acaaaccgtt aatcgccata tcaccgtgg ggtgaataacc 1020
gcgttagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcgta acacggccctc actggagatt 1080
65 ccaacgcagc cgattgggtgg gctgacttgc tcgggtccgg caaagccatc aacactgata 1140
tttactgcgt gatctgttacc aacgtcatcg gtgggttgcggaa cggttccacc ggacctggct 1200
ccatgcattcc agatggaaat ttctggggta atcgcttcccc cggccacgttcc attcgatc 1260
```

aggtaaaacgc cgaaaaacaa ttccctcgacg cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320
5 ttggtggttc catgggtggt gcccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaaactg 1380
ttggcgcage tgctgttctt gcagtttctg cacgcgcagc cgccctggcaa atcggcattc 1440
aatccgcccc aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
10 aatccggctg caacccagcc accggactcg gcgccgcccc acgcatacgcc cacctcacct 1560
accgtggcga actagaaaatc gacgaacgct tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620
15 cactcggtcc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgcgt ggaatcctac ttggactacc 1680
aagcagacaa gctagttacag cgtttcgacg ccggctccta cgttttgcac accgacgccc 1740
tcaaccgcca cgacattggt cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
20 aagttccagt ccttgcgcgca ggcgttagata ccgatattt gtacccctac caccagcaag 1860
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tccccctgtcg 1920
25 gccacgatgc ttccctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgtaggg aacttcttca 1980
gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaaacta 2040
gttcggaccc agggatatacg tcgacatcga tgctttctg cguttaattaa caattggat 2100
30 cctcttagagt tctgtaaaaa acaccgtggg gcagtttctg ctgcgggtg ttttttattt 2160
gtggggcact agaccggga tttaaatcgc tagcgggtg ctaaaggaag cggAACACGT 2220
35 agaaagccag tccgcagaaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggttatct 2280
ggacaaggaa aaacgcagaac gcaaagagaa agcaggtac ttgcagtggg cttacatggc 2340
gatagctaga ctggccggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400
40 cctctggtaa ggttggaaag ccctgcaaaag taaaactggat ggctttctg cggccaaggaa 2460
tctgatggcg cagggatca agatctgate aagagacagg atgaggatcg ttgcacatga 2520
45 ttgaacaaga tggattgcac gcagggtctc cggccgctt ggtggagagg ctattcggct 2580
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgtatcgcc cgtgtccgg ctgtcagcgc 2640
aggggcgcgg ggttctttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaaactgcagg 2700
50 acgaggcagc gggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgc gctgtgcac 2760
acggtgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtggcgg gggcaggatc 2820
55 tcctgtcatc tcaccttgc cctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
ggctgcatac gcttgcaccc gctacctgccc cattgcacca ccaagcgaaa catcgatcg 2940
agcgagcact tactcggatg gaagccggc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000
60 atcaggggct cgcccgagcc gaactgttcg ccaggctaa ggccgcgcatg cccgacggcg 3060
aggatctcgatcgatccat ggcgcacccat gcttgcgc gtttgcggaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120
65 gcttttctgg attcatacgac tggccggc tgggtgtggc ggaccgcgtat caggacatag 3180
cggtggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggccggc gatggctgac cgtttcctcg 3240
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgatcgc cttctatcgc cttcttgcacg 3300

agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
5 atcacgagat ttgcattcca ccggccgcctt ctatgaaagg ttgggttcg gaatcgaaaa 3420
ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccc 3480
cgctageggc ggcggggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatcgta aggagaaaaat 3540
10 accgcattcag ggcgttccg ctttccctcg tcactgactc gctgcgctcg gtcgttccggc 3600
tgccggcggc ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca gaatcagggg 3660
15 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3720
ccgcgttgcg ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
gctcaagtca gaggtggcga aaccggacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840
20 gaagctccct cgtgcgtct cctgttccga ccctgccgt tacggatac ctgtccgcct 3900
ttctcccttc gggaaagcgtg gcgcgttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcgg 3960
25 tgttaggtcg tgcgttccaaag ctgggtgtg tgcacgaacc ccccggttccag cccgaccgct 4020
gcgccttatac cggttaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac 4080
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgttaggcggt gctacagagt 4140
30 tcttgaagtg gtggcttaac tacggctaca ctggatggac agtatttggt atctgcgtc 4200
tgctgaagcc agttacccctc ggaaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260
35 ccgctggtag cggtggtttt ttgtttgca agcagcagat tacggcaga aaaaaaggat 4320
ctcaagaaga tcccttgcata tttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac 4380
gttaaggat tttggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg 4440
40 ccggccgcgg ccgcgc当地 tccgcgttgc tgaaaatttt cgtgcgcgt gatggccgc 4500
caaaaaactt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560
45 atggccgc当地 atcatcagct atggatctct ctgtatgcgc gctggagtcc gacgcgtcg 4620
atgctgcgtt cgattaaaa acgggtatcg gatggccgc当地 agctctcgat acgacggacg 4680
cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc 4740
50 ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgtc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800
aggatgcaat cagttgcgc当地 tactgcggtg gcctgattcc tccccggccct gacccgc当地 4860
55 gacggcgc当地 aaaaatttgc tcagatgcgt gtgcgtgc当地 agccagccgc gagcgc当地 4920
acaaaacgc当地 cggccgaggag ctggaggccg ctggatgc当地 aatggcgctg gaagtgc当地 4980
ccccgagc当地 aattttggcc atggatgc当地 cagagctgg当地 agcggcagc当地 agaattatcg 5040
60 cgatcgtggc ggtgc当地 ggcatgac当地 acatcgaaa tgccgc当地 cgtgc当地 5100
ggccgc当地 gagcgtgc当地 cggccacc当地 acctgc当地 acatggc当地 agcgtgc当地 5160
gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg 5220
65 aacgccccgt gagcgtaac tcacaggcg tcggctaacc cccagtc当地 acctgggaga 5280
aagcgctcaa aatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340

tccgctgatc tgttcgacac ccatcccag ctcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400
5 gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460
cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat 5520
accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccgtt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580
10 acgcgcgcgt gcttgcctg gacattgtatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640
agcacgtaaa ccccgaggta tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700
15 cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcga gctcatctgg ctcattgatc 5760
cggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgcaccg 5820
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgtgacc aggcttttc acataggctg agccgtggcc 5880
20 actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940
gccttagctga tcttatggag gttgctcgca tgcgttcagg cacagaaaaa cctaaaaaac 6000
25 gctatgagca ggagttttct agccggacggg cacgtatcgaa agccggcaaga aaagccactg 6060
cggaagcaaa agcaattgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgcgcgt gaagcgtctg 6120
gagagctgat cgacggcgcc cgtgtccctt ggactgtcc agggcgtgcc gcccgtgatc 6180
30 agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240
taaaagacac caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg 6300
35 gaggaggccg tgagcctgat ctgccgcgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420
agagccagcc g 6431
40 <210> 46
<211> 6439
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
45 <220>
<223> SEQ_ID_46_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1831_META
50 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(183)
<223> P1701/1831
55 <220>
<221> misc_feature
<222> (199)..(1329)
<223> MetA without startcodon
60 <220>
<221> misc_feature
<222> (1397)..(1466)
<223> GroEL Terminator
65 <220>
<221> misc_feature
<222> (1810)..(2601)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2868)..(3728)
<223> Ori-EC(pMB) complement
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (3874)..(4548)
<223> Orf1
10
<220>
<221> misc_feature
<222> (4882)..(6003)
<223> REP Protein
15
<400> 46
aaatctcgag cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcacccct caacagttga 60
gtgctggcac ttcgcgggtt agagtgc当地 atagggttgg tgacacacag ttgttcaccc 120
20 gcgacgacgg ctgtgctgga aacccacaac cggcacacac aaaattttc tcatggaggg 180
attgcggccg cgcatatgcc caccctcgcg cttcaggc aacttggaaat ccaagcgatc 240
25 ggtgatgtct ccaccgaagc cggagcaatc attacaaacg ctgaaatcgc ctatcaccgc 300
tgggtgaat accgcgtaga taaaagaagga cgcagcaatg tcgttctcat cgaacacgccc 360
30 ctcactggag attccaaacgc agccgattgg tggctgact tgctcggtcc cggcaaagcc 420
atcaacactg atatttactg cgtgatctgt accaacgtca tgggtggttt caacggttcc 480
accggacctg gctccatgca tccagatgga aatttctggg gtaatcgctt ccccgccacg 540
35 tccattcgtg atcaggtaaa cggccaaaaaa caattcctcg acgcactcg catcaccacg 600
gtcgccgcag tacttggtgg ttccatgggt ggtgcgc当地 cccttagatg ggccgc当地 660
40 tacccagaaaa ctgttggcgc agctgctgtt cttgcagttt ctgcacgc当地 cagcgc当地 720
caaatcgca ttcaatccgc ccaaattaag gcgattgaaa acgaccacca ctggcacgaa 780
ggcaactact acgaatccgg ctgcaaccca gccaccggac tcggccgc当地 cgc当地 840
45 gcccacctca cttaccgtgg cgaactagaa atcgacgaac gttcggc当地 caaagccaa 900
aagaacgaaa acccactcg cccctaccgc aagccccgacc agcgttgc当地 cgtggaaatcc 960
50 tacttggact accaaggcaga caagcttagta cagcgttgc当地 acgc当地 ctc当地 1020
ctcaccgacg ccctcaaccg ccacgacatt ggtcgccgacc gcggaggccct caacaaggca 1080
ctcgaatcca tcaaagttcc agtcctgtc gcaggcgttag ataccgatat ttgttacccc 1140
55 taccaccagc aagaacacccct cttccagaaaa acgtggaaatc tactggcaat ggccaaaaatc 1200
gtatccccctg tcggccacga tgcttc当地 accgaaagcc gccaaatgga tcgc当地 cgtg 1260
60 aggaacttct tcagcctcat ctccccagac gaagacaacc cttcgaccta catcgatcc 1320
tacatctaaa ctagtc当地 ccttagggata tcgtcgacat cgtatc当地 ctgc当地 1380
taacaattgg gatcctctag agttctgtga aaaacaccgt gggc当地 gttt ctgc当地 cgg 1440
65 gtgttttta ttgtggggc actagaccccg ggatttaat cgctagc当地 ctgctaaagg 1500
aagcggaaaca cgtagaaaagc cagtc当地 cgg 1560

tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgaaaga gaaaggcaggt agcttgcagt 1620
gggcttacat ggcgatacg actggcg gtttatgga cagcaagcga accggaattg 1680
5 ccagctgggg cgccctctgg taagggtggg aagccctgca aagtaaactg gatggcttc 1740
ttgccgccaa ggatctgatg gcgcaggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga 1800
10 tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag 1860
aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcgct gctctgatgc cgccgtgttc 1920
cggctgtcag cgcaggggcg cccggttttt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg 1980
15 aatgaactgc aggacgagge agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc 2040
gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaaggact ggctgctatt gggcgaagtg 2100
20 cggggcagg atctcctgtc atctcacctt gtcctgtcc agaaagtatc catcatggct 2160
gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gcccattcga ccaccaagcg 2220
aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcg atggaagccg gtcttgcga tcaggatgat 2280
25 ctggacgaag agcatcaggg gctcgccca gccgaactgt tcgcccaggct caaggcgcgc 2340
atgcccggacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcga gaatatcatg 2400
30 gtggaaaaatg gccgctttc tggattcattc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc 2460
tatcaggaca tagcgttggc taccctgtat attgctgaag agcttggcg cgaatggct 2520
gaccgcttcc tcgtgtttt cggatcgcc gctcccgatt cgacgcgc cgccttctat 2580
35 cgccttcttgc acgagttttt ctgagcggga ctctggggtt cgaaatgacc gaccaagcga 2640
cgcccaaccc gccatcacga gatttcgatt ccaccgcgc cttctatgaa aggttggct 2700
40 tcggaatcgt ttccggac gccggctgga tgatcctcca gcgccccggat ctcatgctgg 2760
agttcttcgc ccacgcttagc ggcgcgcggg ccggccccgt gtgaaatacc gcacagatgc 2820
gtaaggagaa aataccgcac caggcgctt tccgcttctt cgctactga ctcgctgcgc 2880
45 tcggtcgttgc ggctcgccgc agcggtatca gtcactcaa aggccgtaat acggttatcc 2940
acagaatcag gggataacgc agggaaagaaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg 3000
50 aaccgtaaaa agggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcggggcc tgacgagcat 3060
cacaaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataaccag 3120
gcgtttccccc ctggaaatgc ctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcg gcttaccgg 3180
55 tacctgtccg ctttctccc ttccggaaagc gtggcgctt ctcatagctc acgctgttagg 3240
tatctcagtt cgggttaggt cggtcgctcc aagctggct gtgtgcacga acccccccgtt 3300
60 cagccccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgcttgc agtccaaaccc ggtaagacac 3360
gacttatacg cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgttaggc 3420
ggtgctacag agttcttgaa gtggtggctt aactacggct acactagaag gacagtatcc 3480
65 ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccggaaaaa gagttggtag ctcttgcgtcc 3540
ggcaaaacaaa ccaccgcgtgg tagcggtgggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc 3600

agaaaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atctttcta cggggctga cgctcagtgg 3660
aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat ctgcacccat 3720
5 atcctttaa aggccggccg cggccgcga aagtcccgt tcgtgaaaat ttctgtgccg 3780
cgtgatttgc cgccaaaaac tttAACGAAC gttcggtata atgggtgtcat gacccatcacg 3840
acgaagtact aaaattggcc cgaatcatca gctatggatc tctctgtatgt cgccgtggag 3900
10 tccgacgcgc tcgatgtgc cgtcgattta aaaacggtga tcggatTTT ccgagctctc 3960
gatacgacgg acgcgcgcagc atacacgagac tggggccagtgc cgcgcagcga cctagaaact 4020
15 ctctgtggcggt atcttgagga gctggctgac gagctgcgtg ctccggccagc gccaggagga 4080
cgcacagtag tggaggatgc aatcagttgc gcctactgcgt gtggcctgtat tcctccccgg 4140
20 cctgacccgc gaggacggcg cgcggaaatata tgctcagatgc cgtgtcggtgc cgcagccagc 4200
cgccgagcgcgc ccaacaaaacg ccacgcccag gagctggagg cggctagggtc gcaaattggcg 4260
ctggaaagtgc gtcccccgag cggaaattttg gccatggtgc tcacagagct ggaagcggca 4320
25 gcgagaattt tcgcgatcgt ggcgggtgccc gcaggcatga caaacatcgt aaatgccgcg 4380
tttcgtgtgc cgtggccgc caggacgtgt cagcgcgcacc accacctgca ccgaatcgcc 4440
30 agcagcgtcg cgcgtcgaaa aagcgcacag gccggcaagaa gcgataagct gcacgaatac 4500
ctgaaaaatg ttgaacgccc cgtgagcgggt aactcacagg gcgtcggcta acccccagtc 4560
caaacctggg agaaagcgtt caaaaatgac tctagcggat tcacgagaca ttgacacacc 4620
35 ggcctggaaa tttccgctg atctgttgcac caccatccc gagctcgccgc tgccatcacg 4680
tggctggacg agcgaagacc gccgcgaatt ctcgcgtac ctggggccagag aaaaatttcca 4740
40 cagccgaagt tataccgagt tggttcaaaa tcgcttgcac ggtgccagta tggtgtctg 4860
acgcacgcgc agcacgcgc cgtgcttgcctc ctggacattt atgtgccgag ccaccaggcc 4920
45 ggcggggaaa tcgagcacgt aaaccccgag gtctacgcgtat tttggagcg ctgggcacgc 4980
ctggaaaaag cgccagcttg gatccgcgtg aatccactga gcggggaaatg ccagctcatc 5040
50 tggctcattt atccgggtgtat tgccgcagca ggcatgagca gcccgaatat gccgcctgt 5100
gctgcaacga ccgagggaaat gaccccggtt ttccggcgtt accaggcttt ttccatagg 5160
ctgagccgtg gccactgcac tctccgacga tcccagccgtt accgcgtggca tgcccgacac 5220
55 aatcgcgtgg atcgcctacgt tgatcttgcgtt gagggttgcgc gcatgatctc aggcacagaa 5280
aaacctaaaaa aacgcgtatga gcaggagttt tctagcggac gggcacgtat cgaagcggca 5340
60 agaaaagcca ctgcggaaagc aaaagcactt gccacgcctt aagcaagcctt gccgagcgc 5400
gctgaagcgt ctggagagct gatcgacggc gtccgtgtcc tctggactgc tccaggccgt 5460
gccgccccgtg atgagacggc ttttcgcccac gctttgactg tgggatacca gttaaaagcg 5520
65 gctgggtgagc gcctaaaaaga caccaagggtt catcgacccat acgagcgtgc ctacaccgtc 5580
gctcaggcgg tcggaggagg ccgtgagcctt gatctgcgc cggactgtga cccgcagacg 5640

gattggccgc gacgtgtgcg cggctacgtc gctaaaggcc agccagtcgt ccctgctcg 5700
cagacagaga cgccagagcca gccgaggcga aaagctctgg ccactatggg aagacgtggc 5760
5 ggtaaaaagg ccgcagaacg ctggaaagac ccaaacagtg agtacgccc agcacagcga 5820
gaaaaactag ctaagtccag tcaacacaca gctaggaaag ctaaaggaaa tcgcttgacc 5880
10 attgcaggtt ggtttatgac tggtagggg gagactggct cgtggccgac aatcaatgaa 5940
gctatgtctg aatttagcgt gtcacgtcag accgtgaata gagcactaa ggtctgcggg 6000
cattgaacct ccacgaggac gccgaaagct tcccagtaaa tgtgccatct cgtaggcaga 6060
15 aaacggttcc cccgttagggt ctctctcttgc gcctccttc taggtcgggc tgattgctct 6120
tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg ttccccaccg gctcgccctcg 6180
taagcgcaca aggactgctc ccaaagatct tcaaagccac tgccgcact gcctcgcga 6240
20 agccttgcgc cgcggaaatt tcctccaccg agttcgtgca caccctatg ccaagcttct 6300
ttcacccctaa attcgagaga ttggattttt accgtggaaa ttcttcgcaa aaatcgtccc 6360
25 ctgatcgcccc ttgcgacggtt ggcgtcggtg ccgctgggtcg cgttggctt gaccgacttg 6420
atcagcggcc gtcgattt 6439

30 <210> 47
<211> 6431
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

35 <220>
<223> SEQ_ID_47_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1832_META

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899)
<223> P1701/1832

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
<223> MetA without startcodon

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (2104)..(2173)
<223> GroEL Terminator

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (2517)..(3308)
<223> KanR

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (3575)..(4435)
<223> Ori-EC(pMB) complement

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (4581)..(5255)
<223> Orf1

<220>

<221> misc_feature
<222> (5589)..(279)
<223> REP Protein

5 <400> 47
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggt aaaaaggcccgc agaacgctgg 60
aaagacccaa acagttagta cgccccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
10 cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattt caggttggtt tatgactgtt 180
gagggagaga ctggctcgta gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
15 cgtcagaccc tgaatagagc acttaaggc tgccggcatt gaacttccac gaggacgccc 300
aaagcttccc agtaaatgtt ccatctcgta ggcagaaaaac ggttcccccg tagggctct 360
ctcttggct ctttcttagg tcgggctgat tgctttgaa gctctctagg ggggctcaca 420
20 ccataggcag ataacgttcc ccacccggcgc gcctcgtaag cgccacaagga ctgtccccaa 480
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgcccccg gaaatttcct 540
25 ccaccggatt cgtgcacacc cctatgcca gtttttca ccctaaattt gagagattgg 600
attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtccccgttgc gacgttggcg 660
tcgggtggcgc tgggttgcgt tggcttgacc gacttgatca gccggcgcgc gatttaaattt 720
30 tcgagcggct taaagttgg ctgcccattgtt aatttttagt accctcaaca gttgagtgtt 780
ggcactctcg gggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt cacccgcgac 840
35 gacggctgtt ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg gagagattgc 900
atatgccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggt gatgtctcca 960
ccgaaggccgg agcaatcatt acaaaccgtt aaatcgccat tcaccgctgg ggtgaataacc 1020
40 gcgttagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatgca acacccctc actggagatt 1080
ccaaacgcagc cgattttgg gctgacttgc tcgggtccgg caaagccatc aacactgata 1140
45 ttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaaa cggttccacc ggacctggct 1200
ccatgcatttcc agatggaaat ttctgggtt atcgcttccc cggccacgtcc attcgtgatc 1260
aggtaaacgc cgaaaaacaa ttccctcgacg cactcgccat caccacggc gccgcagttac 1320
50 ttgggtggttc catgggttgtt gcccgcaccc tagagtggc cgcaatgtac ccagaaactt 1380
ttggcgcagc tgctttctt gcagtttctg cacgcgcacag cgcctggcaa atcggcattt 1440
55 aatccgcacca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
aatccggctt caaccaggcc accggactcg gcggccccc acgcacatgcc cacctcacct 1560
accgtggcga actagaaatc gacgaacgct tcggcacca agccaaaaag aacgaaaacc 1620
60 cactcggtcc ctaccgcaag cccgaccaggc gttcgccgt ggaatcctac ttggactacc 1680
aagcagacaa gcttagtacag cgtttcgacg cccgctctca cgtcttgcgc accgacgccc 1740
65 tcaaccggcca cgacatttgtt cggcaccggc gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
aagttccagt ctttgcgtt ggcgttagata ccgatattt gtaccctac caccagcaag 1860
aacaccccttc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tccccctgtcg 1920

5 gccacgatgc tttcctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgagg aacttcttca 1980
 gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040
 gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctttctg cgtaattaa caattggat 2100
 cctcttagagt tctgtaaaaa acaccgtggg gcagttctg cttcgcgtg ttttttattt 2160
10 gtggggcaact agaccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggAACACGT 2220
 agaaagccag tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280
15 ggacaaggaa aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtac ttgcagtggg cttacatggc 2340
 gatactaga ctggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400
 cctctggtaa ggttggaaag ccctgcaaag taaactggat ggcttctg cgcggcaaggaa 2460
20 tctgatggcg caggggatca agatctgtac aagagacagg atgaggatcg tttcgatca 2520
 ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgctt ggtggagagg ctattcgct 2580
25 atgactgggc acaacagaca atcggctgtc ctgatgccgc cgtttccgg ctgtcagcgc 2640
 aggggcgcgc ggttctttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaaactgcagg 2700
 acgaggcagc gcggctatcg tggctggca cgacgggctg tcctgcgcgca gctgtgctcg 2760
30 acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgc gggcaggatc 2820
 tcctgtcatc tcacccgtc cctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
35 ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgatcg 2940
 agcgagcact tactcgatg gaagccggc ttgtcgatca ggtatcgatc gacgaagagc 3000
 atcaggggct cgccgcgcgc gaaactgttcg ccaggctaa ggcgcgcgc cccgacggcgc 3060
40 aggatctcgatcgt gtcgatccat ggcgatgcct gcttgcgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120
 gctttctgg attcatcgac tggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180
45 cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240
 tgctttacgg tatcgccgtc cccgattcgc agcgcatcg cttctatcgc cttcttgacg 3300
 agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
50 atcacgagat ttcgattcca ccgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgaaaa 3420
 ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcggca 3480
55 cgctagcgcc gcgcggccgc gccccgtgtg aaataccgca cagatgcgtaa aggagaaaaat 3540
 accgcacatcg gcgctttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgtcg gtcgttcggc 3600
 tgcggcgagc ggtatcgatc cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg 3660
60 ataacgcagg aaagaacatcg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccagggaaac cgtaaaaagg 3720
 ccgcgttgc ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
65 gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840
 gaagctccct cgtgcgtct cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct 3900
 ttctcccttc gggaaagcggtg gcgcgttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcgg 3960

46

tgttaggtcg tgcgtccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 4020
5 ggcgccttatac cggttaactat cgtcttgagt ccaacccgggt aagacacgac ttatgccac 4080
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt 4140
tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc 4200
10 tgctgaagcc agttacccctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260
ccgctggtag cggtggtttt ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320
15 ctcagaaga tccttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac 4380
gttaaggat tttggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg 4440
ccggccgcgg ccgcgcAAAG tcccgttcg tgAAAATTT cgtgccgcgt gattttccgc 4500
20 cAAAAACTTT aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560
attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgcctcg 4620
25 atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gattttccg agctctcgat acgacggacg 4680
cgccagcatc acgagaactgg gccagtgcgg cgagcgcacct agaaaactctc gtggcggatc 4740
ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800
30 aggatgcaat cagttgcgc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag 4860
gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt: gtcgtgcgc agccagccgc gagcgcgcaca 4920
35 acaaacgcaca cggcggaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgcctg gaagtgcgtc 4980
ccccgagcga aatttggcc atggatcgta cagagcttggaa agcggcagcg agaattatcg 5040
cgatcgtggc ggtgcggcga ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgtt cgtgtgcgcgt 5100
40 ggcgcggccag gacgtgtcag cggcgcacc acctgtcacgg aatcggcagc agcgtgcgc 5160
gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg 5220
45 aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtc当地 acctggaga 5280
aagcgctcaa aaatgactct agcggattca cgagacattt acacaccggc ctggaaattt 5340
tccgctgatc tggtcgacac ccatcccgag ctcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400
50 gaagaccgcgc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460
cgcgacttcg ccagcgcttgc gatcaaagac cggacacgg agaaaacacag ccgaagttat 5520
55 accgagttgg ttcaaaatcg ctggccggc gccagttatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580
acgcagccgt gcttgcctg gacattgttg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640
agcacgtaaa ccccgaggc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700
60 cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcattgatc 5760
cggtgtatgc cgacgcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgcgtggct gcaacgcacc 5820
65 aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggcttttc acataggctg agccgtggcc 5880
actgcactct ccgcacatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940
gccttagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac 6000

gctatgagca ggagtttct acggacggg cacgtatcga acggcaaga aaagccactg 6060
cggaagcaaa agcaattgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgcgcgt gaagcgtctg 6120
5 gagagctgat cgacggcgtc cgtgtccctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg 6180
agacggctt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaaggcgct ggtgagcgcc 6240
10 taaaagacac caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg 6300
gaggaggccg tgagcctgat ctgccgcgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
15 gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420
agagccagcc g 6431

<210> 48
20 <211> 6431
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
25 <223> SEQ_ID_48_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1833_META

<220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899)
30 <223> P1701/1833

<220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
35 <223> MetA without startcodon

<220>
<221> misc_feature
<222> (2104)..(2173)
40 <223> GroEL Terminator

<220>
<221> misc_feature
<222> (2517)..(3308)
45 <223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3575)..(4435)
50 <223> Ori-EC(pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4581)..(5255)
55 <223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (5589)..(279)
60 <223> REP Protein

<400> 48
aggcgaaaag ctctggccac tatggaaaga cgtggcggtta aaaaggccgc agaacgctgg 60
65 aaagacccaa acagttagta cgcggcggca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtc当地 120
cgacaagctaa ggaaatcgc ttgaccattt caggttggtt tatgactgtt 180

gagggagaga ctggctcgta gcccacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
cgtcagaccc tgaatagagc acttaaggc tgccggcatt gaacttccac gaggacgccc 300
5 aaagcttccc agtaaatgtc ccatctcgta ggcagaaaaac ggttcccccg tagggtctct 360
ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttcaa gctctctagg ggggctcaca 420
ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgacacaagga ctgctccaa 480
10 agatcttcaa agccactgccc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgccc gaaatttcct 540
ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgcca gcttcttca ccctaaattc gagagattgg 600
15 attcttaccc tgaaaattct tcgaaaaat cgtccccctga tcgccttgc gacggtggcg 660
tcggtgccgc tgggtcgct tggcttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaattc 720
20 tcgagcggct taaagttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgc 780
ggcactctcg gggtagagt gccaaatagg ttgttgaca cacagttgtt cacccgac 840
gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat tttctcatg aggagattgc 900
25 atatgcccac cctcgccct tcaggtcaac ttgaaaatcca agcgatcggt gatgtctcca 960
ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgcttca tcaccgctgg ggtgaataacc
30 gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcg acacgcctc actggagatt 1080
ccaacgcagc cgattgggg gctgacttgc tcggtccccg caaagccatc aacactgata 1140
tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaaa cggttccacc ggacctggct 1200
35 ccatgcattcc agatggaaat ttctgggtta atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260
aggtaaacgc cgaaaaacaa ttctcgacg cactcgccat caccacggc gccgcagtac 1320
ttggtgttgc catgggttgt gcccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380
40 ttggcgcagc tgctgttctt gcagttctg cacgcgcctg cgcctggcaaa atcggcattt 1440
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
45 aatccggctg caacccagcc accggactcg gcgcgcggc acgcacatgcc cacctcacct 1560
accgtggcga actagaaaatc gacgaacgct tcggcacca agccaaaag aacgaaaacc 1620
50 cactcggtcc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgcgt ggaatcctac ttggactacc 1680
aagcagacaa gcttagtacag cggttcgacg ccggctctta cgtttgctc accgacgccc 1740
tcaaccgcca cgacattggt cgccgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
55 aagttccagt cttgtcgca ggcgttagata ccgatattt gtaccctac caccagcaag 1860
aacacctctc cagaaacctg gggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tccccctgtcg 1920
60 gccacgtgc ttccctcacc gaaagccgc aaatggatcg catcgtaggg aacttcttca 1980
gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040
gttcggaccc agggatatcg tcgacatcgta tgctcttctg cgttaattaa caattggat 2100
65 cctcttagagt tctgtaaaaa acaccgtggg gcagttctg cttcgccgtg ttttttattt 2160
gtggggcact agaccggga tttaaatcgc tagcgggtg ctaaaggaag cgaaacacgt 2220

agaaaagccag tccgcagaaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280
ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggttagc ttgcagtggg cttacatggc 2340
5 gatacgtaga ctggggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc a gctggggcgc 2400
cctctggtaa gggtgggaag ccctgcaaag taaaactggat ggcttccttgc cggccaagga 2460
tctgtatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttgcgtatga 2520
10 ttgaacaaga tggattgcac gcagggtctc cggccgcttgc ggtggagagg ctattcgct 2580
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640
15 agggggcgccc gggttctttt gtcaagaccc acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700
acgaggcagc gcggttatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgc gctgtgcctcg 2760
20 acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgg gggcaggatc 2820
tcctgtcatc tcaccttgct cctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa categcatcg 2940
25 agcgagcacg tactcgatg gaagccggc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000
atcaggggct cgcgcacagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgc gcccacggcg 3060
30 aggatctcg ctgtgacccat ggcgtatcgct gcttgcgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120
gctttctgg attcatcgac tggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180
cggtggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggccggc atgggtgcac cgcttcctcg 3240
35 tgctttacgg tatacgccgt cccgatcgac agcgcatcg cttctatcg cttcttgacg 3300
agttttctg agcgggactc tgggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
40 atcacgagat ttgcattcca ccgcgcctt ctatgaaagg ttgggttcg gaatcgaaaa 3420
ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc 3480
cgctagcgcc gcgcggccg gccgggtgtg aaataccgca cagatgcgtc aggagaaaaat 3540
. 45 accgcacatcg ggcgtttcc gtttcctcg tcactgactc gtcgtgcgtcg gtcgttcggc 3600
tgccggcagc ggtatcgatc cactcaaagg cggtaataacg gttatccaca gaatcagggg 3660
50 ataacgcagg aaagaacatg tgacaaaagg gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3720
ccgcgttgc ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaaag ataccaggcg tttccccctg 3840
55 gaagctccct cgtgcgtct cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct 3900
ttctcccttc gggaaagcgtg gcgcgttctc atagctcactc ctgttaggtat ctcagttcgg 3960
60 tgttaggtcg tgcgtccaag ctgggtgtg tgacgaaacc ccccggttcag cccgaccgct 4020
gcccgccttac cggtaactat cgtcttgcgt ccaacccggta aagacacgc ttatcgccac 4080
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcggaggt tgtagggcggt gctacagagt 4140
65 tcttgaagtg gtggcttaac tacggctaca ctagaaggac agtattttggt atctcgctc 4200
tgctgaagcc agttacccatc gggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260

ccgctggtag cggtggaaaa tttgttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320
ctcaagaaga tccttgcata ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac 4380
5 gttaaggat tttggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg 4440
ccggccgcgg ccgcgcAAAG tcccgcTTcg tgAAAATTT cgtgccgcgt gatTTCCGc 4500
10 caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560
attggcccgat atcatcagct atggatctt ctgatgcgc gctggagtcc gacgcgcTcg 4620
atgctgccgt cgattaaaa acggtgatcg gatTTCCG agctctcgat acgacggacg 4680
15 cgccagcatc acgagactgg gccagtGCCG cgagcgcacct agaaactctc gtggcggatc 4740
ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcGCC aggaggacgc acagtagtgg 4800
20 agatgcaat cagttgcGCC tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag 4860
gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtGCCg acccagcGCc gagcgcgcCA 4920
acaaacgcCA cggcggaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980
25 ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcga agaattatcg 5040
cgatcgtggc ggtgcggcga ggcatacaca acatcgtaaa tgccgcgtt cgtgtgcgcgt 5100
30 ggcgcGCCAG gacgtgtcag cggcGCCacc acctgcacccg aatcggcagc agcgtgcgc 5160
gtcgaaaaAG cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgtt 5220
aacgcGGCGT gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga 5280
35 aagcgcctaa aatgactct agcggattca cgagacattt acacacccgc ctggaaattt 5340
tccgctgatc tgttcgacac ccatcccggag ctcgcgcTgc gatcacgtgg ctggacgac 5400
40 gaagacccgc gcaaatcct cgtcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460
cgcgacttcg ccagcgcTTg gatcaaagac cggacacacgg agaaacacacg ccgaagttat 5520
accgagttgg ttcaaaatcg ctgcggcggt gccagttatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580
45 acgcagccgt gcttgcctg gacattgttg tgccgagcca ccaggcCGC gggAAAATCG 5640
agcacgtaaa ccccggggTC tacgcgattt tggagcgcTg ggcacgcctg gaaaaAGCgC 5700
50 cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatGCCa gctcatctgg ctcattgatc 5760
cggtgtatgc cgcacgcggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgcggct gcaacgcaccc 5820
aggaaatgac cggcgTTTC ggcgcgtgacc aggcttttc acataggctg agccgtggcc 5880
55 actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940
gcctagctga tcttatggag gttgcgcAca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaaAC 6000
60 gctatgagca ggagtttct acggacgggg cacgtatcg aacgcgcAAG aaagccactg 6060
cggaagcaaa agcacttgcc acgcTTGAAG caagcctGCC gagcGCCgt gaaagcgtctg 6120
gagagctgat cgcggcgtc cgtgtccctt ggactgcTCC agggcgtgCC gcccgtgatc 6180
65 agacggctt tcgcccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcGCC 6240
taaaagacac caagggtcat cggcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggatc 6300

gaggaggccg tgagcctgat ctgccgcgg actgtgaccc ccagacggat tggccgcgac 6360
gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtag acagagacgc 6420
5 agagccagcc g 6431

10 <210> 49
<211> 6431
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

15 <220>
<223> SEQ_ID_49_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1834_META

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899)
<223> P1701/1834

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
<223> MetA without startcodon

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (2104)..(2173)
<223> GroEL Terminator

35 <220>
<221> misc feature
<222> (2517)..(3308)
<223> KanR

40 <220>
<221> misc feature
<222> (3575)..(4435)
<223> Ori-EC(pMB) complement

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (4581)..(5255)
<223> Orf1

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (5589)..(279)
<223> REP Protein

55 <400> 49
aggcgaaaag ctctggccac tatggagaaga cgtggcggta aaaaggccgc agaacgctgg 60
aaagacccaa acagttagta cgccccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
55 cgacaagcta ggaaagctaa agggaaatcgc ttgaccatg caggttggtt tatgactgtt 180
gagggagaga ctggctcgta gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
60 cgtcagaccc tgaatagagc acttaaggc tcgcggcatt gaacttccac gaggacgccc 300
aaagcttccc agtaaatgtg ccatctcgta ggcagaaaaac ggttcccccg tagggctct 360
65 ctcttggcct ctttctagg tcgggctgat tgctcttcaa gctctctagg ggggctcaca 420
ccataggcag ataacgttcc ccacccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttcct 540

ccaccggagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttcttca ccctaaattc gagagattgg 600
5 attcttaccg tggaaattct tcgaaaaat cgtccccgtga tcgccttgc gacgttggcg 660
tcgggtgccgc tggttgcgt tggttgacc gacttgcata gcggccgctc gattnaaatc 720
tcgagcggtctaaagttgg ctgcccattgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgc 780
10 ggcactctcg ggggttagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt cacccgcgac 840
gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg aagggattgc 900
15 atatgcccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggt gatgtctcca 960
ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatgccta tcaccgctgg ggtgaataacc 1020
gcgttagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgcctc actggagatt 1080
20 ccaacgcagc cgattggtgg gctgacttgc tcggtcccg caaagccatc aacactgata 1140
tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaaa cggttccacc ggacctggct 1200
25 ccatgcatcc agatggaaat ttctgggta atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260
aggtaaacgc cgaaaaacaa ttctcgacg cactcgcat caccacggtc gccgcagtac 1320
ttggtggttc catgggtggt gcccgcaccc tagagtggc cgcaatgtac ccagaaaactg 1380
30 ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgcacag cgcctggcaa atcggcattc 1440
aatccgcaca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
aatccggctg caacccagcc accggactcg gcccgcaccc acgcacatcgcc cacctcacct 1560
35 accgtggcga actagaatc gacgaacgct tcggcaccaaa agccaaaag aacgaaaacc 1620
cactcggtcc ctaccgcaccc cccgaccaggc gcttcgcgt ggaatccatc ttggactacc 1680
40 aagcagacaa gctagtacag cgtttcgacg cccgcttcata cgtcttgcac accgacgccc 1740
tcaaccgcaccc cgacattggc cgccgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
45 aagttccagt ccttgcgcaccc ggcgttagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860
aacacctctc cagaaacctg gaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920
gccacgatgc ttccctcacc gaaagccgcaccc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980
50 gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacccatcat cgagttctac atctaaacta 2040
gttcggaccc agggatatcg tcgacatcga tgctttctg cgttaattaa caattggat 2100
55 cctcttagagt tctgtaaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcgttgc ttttttattt 2160
gtggggcact agacccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggAACACGT 2220
agaaaagccag tccgcagaaa cgggtgcgtac cccggatgaa tgtcagctac tgggttatct 2280
60 ggacaaggaa aaacgcacgc gcaaaagagaa agcaggtgc ttgcagtggg cttacatggc 2340
gatagctaga ctggggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400
65 cctctggtaa gggtggaaag cccgtcataag taaaactggat ggctttcttgc ccccaaggaa 2460
tctgtatggcg cagggatgca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttgcgcata 2520
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgccttgc ggtggagagg ctattcggct 2580

atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgtccgg ctgtcagcgc 2640
aggggcgccccc ggttctttt gtcaagaccc acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700
5 acgaggcagc ggggtatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgcctg 2760
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820
10 tcctgtcata tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc catcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg 2940
15 agcgagcacg tactcgatg gaagccggc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000
atcaggggct cgcccgagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgcgt cccgacggcg 3060
aggatctcg tctgaccat ggcgatgcct gcttgcgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120
20 gctttctgg attcatcgac tggccggc tgggtgtggc ggaccgcstat caggacatag 3180
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggccggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240
25 tgctttacgg tatcgccgct cccgatcgac agcgcatcg cttctatcg cttcttgacg 3300
agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
atcacgatg ttcgattcca ccgcgcgcctt ctagaaagg ttgggcttcg gaatcgaaaa 3420
30 ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc 3480
cgctagcgcc gcgcggcccg gcccgggttg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaaat 3540
35 accgcacatcg gcgccttcgcttcactgactc gctgcgcgtc gtcgttcggc 3600
tgccggcgcgc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg 3660
ataacgcagg aaagaacatcg tgagcaaaag gccagaaaa ggccaggaac cgtaaaaaagg 3720
40 ccgcgttgcg ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
gctcaagtcg gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840
45 gaagctccct cgtgcgcgtct cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct 3900
ttctcccttc gggaaagcgtg gcgcgttctc atagctcactc ctgttaggtat ctcagttcgg 3960
tgttaggtcg tgcgtccaaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggttcg cccgaccgc 4020
50 ggcgccttac cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggta aagacacgcac ttatcgccac 4080
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcggatc tgtaggcggt gctacagagt 4140
55 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca cttagaaggac agtatttggt atctgcgcctc 4200
tgctgaagcc agttacccatc gggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260
ccgctggtag cggtggttt ttttttgcg agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320
60 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac 4380
gttaaggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg 4440
65 cccggccggc ccgcgcggaaag tcccgcttcg tgaaaaattt cgtgcgcgtt gatccgc 4500
caaaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgcacg aagtactaaa 4560
atggcccgatc atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcg gacgcgcgtcg 4620

atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatTTTCCG agctctcgat acgacggacg 4680
5 cgcagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc 4740
ttgaggagct ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800
aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag 4860
10 gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtccgc agccagccgc gagcgcgcaca 4920
acaaacgcaca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980
15 ccccgagcga aattttggcc atggcgatca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040
cgatcggtgc ggtgcccgcga ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgtt cgtgtgccgt 5100
ggccgcccag gacgtgtcag cgccgcacc acctgtcaccg aatcggcagc agcgtcgccgc 5160
20 gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgtt 5220
aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtc当地 acctgggaga 5280
aagcgtctaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340
25 tccgctgatc tgttcgacac ccatcccgag ctcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400
gaagaccgcc gcgaatttcc ctgcgtcaccg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460
30 cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat 5520
accgagttgg ttcaaaaatcg cttgcccgtt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580
acgcagccgt gcttgcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640
35 agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgatcc tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700
cagcttggat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcattgatc 5760
40 cggtgtatgc cgacgcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg 5820
aggaaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggcttttc acataggctg agccgtggcc 5880
actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940
45 gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaaac 6000
gctatgagca ggagtttct acggacggg cacgtatcg agcggcaaga aaagccactg 6060
50 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgcgcgt gaagcgtctg 6120
gagagctgat cgacggcgat cgtgtccctct ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtatg 6180
55 agacggctt tcgcccacgtt ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgc 6240
taaaagacac caagggtcat cgaggctacg agcgtgccta caccgtcgat caggcggatc 6300
gaggaggccg tgagcctgat ctggccggcgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
60 gtgtgcgcgg ctacgtcgat aaaggccagc cagtcgtcccc tgctcgatc agagagacgc 6420
agagccagcc g 6431
65 <210> 50
<211> 1005
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_50_FRUCTOSE_1_6_BISPHOSPHATASE

5 <400> 50
 atgaacctaa agaaccccgaa acgcgcagac cgtAACCTTG ctatggagct ggtgcgagtt 60
 acgaaagcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttggac gtggcatgaa gaatgaaggc 120
 10 gacggtgccg ctgttgcacgc catgcgccag ctcatcaact cagtgaccat gaagggcgtc 180
 gttgttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagaggc 240
 15 ggaaccggct ttggacctga ggttgatatc gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300
 atggctgagg gtcgccccaa cgcaatttcc attctcgacgc ctgcagagcg tggcaccatg 360
 tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatgcggc tgggacctga ggccgcaggc 420
 20 aagatcgaca tcgaagctcc agttggccac aacatcaacg cgggtggcaaa gtccaaggga 480
 atcaaccctt ccgacgtcac cgttgcgtg cttgaccgtc ctcgccacat cgaactgatc 540
 25 gcagacatc gtcgtgcagg cgcaaagggtt cgtctcatct ccgacggcga cgttgcaggt 600
 gcagttgcag cagctcagga ttccaaactcc gtggacatca tgatgggcac cggcggaaacc 660
 ccagaaggca tcatactgc gtgcgcctg aagtgcattt gttggcggaaat ccagggcattc 720
 30 ctggcccaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgctggctt gtttttttat 780
 caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccgg 840
 35 gtgaccaacg gtgacatgct ccgtggcggtt tcctaccgcg caaacggcgc aaccaccgt 900
 tccctggta tgcgcgcaaa gtcaggcacc atccgcaca tcgagttctgt ccaccagctg 960
 tccaaagctgc aggaatactc cgtggttgac tacaccacccg cgacc 1005

40 <210> 51
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

45 <400> 51
 Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp Arg Asn Leu Ala Met Glu
 1 5 10 15

50 Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu Ala Ser Gly Arg Trp Val
 20 25 30

55 Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly Ala Ala Val Asp Ala Met
 35 40 45

Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys Gly Val Val Val Ile Gly
 50 55 60

60 Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu Tyr Asn Gly Glu Glu Val
 65 70 75 80

Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp
 85 90 95

65 Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu
 100 105 110

Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr
 115 120 125

5 Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile
 130 135 140

Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly
 145 150 155 160

10 Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His
 165 170 175

Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu
 180 185 190

15 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Gln Asp Ser
 195 200 205

20 Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile
 210 215 220

Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile
 225 230 235 240

25 Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly
 245 250 255

Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp
 260 265 270

30 Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg
 275 280 285

35 Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met
 290 295 300

Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu
 305 310 315 320

40 Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr
 325 330 335

45 <210> 52
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <220>
 <223> SEQ_ID_52_POTENTIELLE_10_REGION_1

55 <400> 52
 tagagt

60 <210> 53
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

65 <220>
 <223> SEQ_ID_53_RIBOSOMALE_BINDUNGSSTELLE\SHINE_DALGARNO

<400> 53
 ggaggaga

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/77 C07K14/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE LEÓN P ET AL: "Streptomyces lividans groES, groEL1 and groEL2 genes." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) NOV 1997, vol. 143 (Pt 11), November 1997 (1997-11), pages 3563-3571, XP002323102 ISSN: 1350-0872 the whole document ----- -/-	1-54

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2005

Date of mailing of the international search report

27/04/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Novak-Giese, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/014263

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TAUSCHEK M ET AL: "Transcriptional analysis of the groESL operon of <i>Neisseria gonorrhoeae</i>" <i>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES</i>, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 189, no. 1, 11 April 1997 (1997-04-11), pages 107-112, XP004059567 ISSN: 0378-1119 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>THIES F L ET AL: "Cloning, sequencing and molecular analysis of the <i>Campylobacter jejuni</i> groESL bicistronic operon." <i>MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND)</i> JAN 1999, vol. 145 (Pt 1), January 1999 (1999-01), pages 89-98, XP002323246 ISSN: 1350-0872 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>GUPTA R S: "EVOLUTION OF THE CHAPERONIN FAMILIES (HSP60, HSP10 AND TCP-1) OF PROTEINS AND THE ORIGIN OF EUKARYOTIC CELLS" <i>MOLECULAR MICROBIOLOGY</i>, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 15, no. 1, 1995, pages 1-11, XP000611319 ISSN: 0950-382X the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>KALINOWSKI J ET AL: "THE COMPLETE <i>CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM</i> ATCC 13032 GENOME SEQUENCE AND ITS IMPACT ON THE PRODUCTION OF L-ASPARTATE-DERIVED AMINO ACIDS AND VITAMINS" <i>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY</i>, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 104, no. 1-3, 4 September 2003 (2003-09-04), pages 5-25, XP001184752 ISSN: 0168-1656 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Function of <i>Corynebacterium glutamicum</i> promoters in <i>Escherichia coli</i>, <i>Streptomyces lividans</i>, and <i>Bacillus subtilis</i>." 4 September 2003 (2003-09-04), <i>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY</i>. 4 SEP 2003, VOL. 104, NR. 1-3, PAGE(S) 325 - 334 , XP002323103 ISSN: 0168-1656 the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/014263

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Promoters of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, vol. 104, no. 1-3, 4 September 2003 (2003-09-04), pages 311-323, XP002323247 ISSN: 0168-1656 the whole document -----	1-54
A	WO 02/40679 A2 (RAYAPATI P J) 23 May 2002 (2002-05-23) the whole document -----	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/014263

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0240679	A2 23-05-2002	AU 3043102 A US 2003017553 A1	27-05-2002 23-01-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014263

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/77 C07K14/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiert Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE LEÓN P ET AL: "Streptomyces lividans groES, groEL1 and groEL2 genes." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) NOV 1997, Bd. 143 (Pt 11), November 1997 (1997-11), Seiten 3563-3571, XP002323102 ISSN: 1350-0872 das ganze Dokument ----- -/-/	1-54

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiteilhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- 'T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- 'X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- 'Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- 'S* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. April 2005

27/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Bevollmächtigter Bediensteter

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Novak-Giese, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PT/EP2004/014263

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	TAUSCHEK M ET AL: "Transcriptional analysis of the groESL operon of Neisseria gonorrhoeae" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 189, Nr. 1, 11. April 1997 (1997-04-11), Seiten 107-112, XP004059567 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument -----	1-54
Y	THIES F L ET AL: "Cloning, sequencing and molecular analysis of the Campylobacter jejuni groESL bicistronic operon." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) JAN 1999, Bd. 145 (Pt 1), Januar 1999 (1999-01), Seiten 89-98, XP002323246 ISSN: 1350-0872 das ganze Dokument -----	1-54
Y	GUPTA R S: "EVOLUTION OF THE CHAPERONIN FAMILIES (HSP60, HSP10 AND TCP-1) OF PROTEINS AND THE ORIGIN OF EUKARYOTIC CELLS" MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, Bd. 15, Nr. 1, 1995, Seiten 1-11, XP000611319 ISSN: 0950-382X das ganze Dokument -----	1-54
Y	KALINOWSKI J ET AL: "THE COMPLETE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ATCC 13032 GENOME SEQUENCE AND ITS IMPACT ON THE PRODUCTION OF L-ASPARTATE-DERIVED AMINO ACIDS AND VITAMINS" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, Bd. 104, Nr. 1-3, 4. September 2003 (2003-09-04), Seiten 5-25, XP001184752 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-54
Y	PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Function of Corynebacterium glutamicum promoters in Escherichia coli, Streptomyces lividans, and Bacillus subtilis." 4. September 2003 (2003-09-04), JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, VOL. 104, NR. 1-3, PAGE(S) 325 - 334 , XP002323103 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-54
	-/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014263

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Promoters of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, Bd. 104, Nr. 1-3, 4. September 2003 (2003-09-04), Seiten 311-323, XP002323247 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-54
A	WO 02/40679 A2 (RAYAPATI P J) 23. Mai 2002 (2002-05-23) das ganze Dokument -----	1-54

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

DE/EP2004/014263

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0240679	A2 23-05-2002	AU 3043102 A US 2003017553 A1	27-05-2002 23-01-2003